



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

Estudio de técnicas alternativas para la extracción de compuestos fenólicos de biomasa agroforestal

Memoria presentada por

Ana Lucía Xavier Saavedra

para optar al grado de Doctor en Ingeniería Química por la

Universidade de Santiago de Compostela

Santiago de Compostela, Febrero 2017



JULIA GONZÁLEZ ÁLVAREZ, Profesora Titular de Universidad, y MARÍA SONIA FREIRE LEIRA, Profesora Contratada-Doctora, del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMAN,

Que la memoria titulada *“Estudio de técnicas alternativas para la extracción de compuestos fenólicos de biomasa agroforestal”* que presenta **ANA LUCÍA XAVIER SAAVEDRA** para optar al Grado de Doctor en Ingeniería Química dentro del Programa de Doctorado Ingeniería Química y Ambiental, fue realizada bajo nuestra inmediata dirección en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firman el presente informe en Santiago de Compostela a 28 de febrero de 2017.

Las Directoras de la Tesis:

Fdo: Julia González Álvarez

Fdo: María Sonia Freire Leira

La Doctoranda:

Fdo: Ana Lucía Xavier Saavedra



AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a lo largo de la realización de este trabajo.

A Julia González Álvarez y a Sonia Freire Leira por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por su ayuda y todos sus consejos.

Al proyecto Emundus 17 por darme la posibilidad de comenzar a realizar este trabajo en España, beneficiándome no solo a nivel educativo sino también a nivel cultural.

A Isabel que me brindó su apoyo y experiencia. A Francisco y Gabriela por su inestimable ayuda en la realización de la etapa final de este trabajo.

A mis compañeros de trabajo en Uruguay, Jorge, Beatriz, Patricia, Rodolfo, Leo, Berta, Leandro, Victoria, Andrés y Anabel que me permitieron venir, que siempre estuvieron pendientes de mí trabajo y me ayudaron cuando lo necesitaba.

A mis amigos españoles, que me tendieron una mano cuando lo necesite, Teresa, Adela, Alicia y Helena

Y especialmente quiero agradecer a mis padres, Artigas y Rosina, a mis hermanas Juliana y Natalia, y a Rafael, por apoyarme siempre, en los buenos y malos momentos





ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 5 |
| 1.OBJETIVOS..... | 9 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 13 |
| 2.1 Los residuos lignocelulósicos..... | 15 |
| 2.2 Los Antioxidantes..... | 16 |
| 2.2.1 Características generales..... | 16 |
| 2.2.2 Antioxidantes en alimentos | 17 |
| 2.2.3 Clasificación de los antioxidantes | 18 |
| 2.2.3.1 Clasificación de los antioxidantes según su función | 18 |
| 2.2.3.2 Clasificación de los antioxidantes según su fuente de obtención..... | 20 |
| 2.2.3.3 Clasificación de los antioxidantes en polifenoles extraíbles (PE) y no extraíbles (PNE) | 26 |
| 2.2.4 Determinación de la actividad antioxidante. Métodos y clasificación. | 26 |
| 2.2.4.1 Ensayos de captura de radicales libres | 27 |
| 2.2.4.2 Ensayos asociados con la peroxidación lipídica..... | 28 |
| 2.3 Extracción de compuestos bioactivos..... | 29 |
| 2.3.1 Sistemas acuosos de dos fases (ATPS). Características generales. | 31 |
| 2.3.2 La curva binodal | 33 |
| 2.3.3 Mecanismo de partición..... | 34 |
| 2.3.4 Influencia de los parámetros de operación sobre la extracción y partición de compuestos fenólicos..... | 36 |
| 2.3.4.1 Longitud de la recta de reparto (LRR) | 36 |
| 2.3.4.2 Tipo de sal | 37 |
| 2.3.4.3 Relación de volúmenes entre fases (V_r)..... | 37 |
| 2.3.4.4 Peso molecular (MW) y concentración del polímero | 37 |
| 2.3.4.5 Temperatura | 38 |
| 2.3.4.6 Tiempo de extracción..... | 38 |
| 2.3.4.7 Relación sólido/líquido (S/L)..... | 38 |
| 2.4 Aplicaciones de los compuestos fenólicos | 39 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 41 |
| 3.1 Materiales. Preparación de la materia prima | 43 |
| 3.1.1 Restos de cizallado de chapas de eucalipto | 43 |

| | |
|--|----|
| 3.1.2 Aserrín de eucalipto..... | 43 |
| 3.1.3 Paja de trigo | 43 |
| 3.2. Extracción con Sistemas acuosos de dos fases (ATPS) | 44 |
| 3.2.1 Estudio de ATPS basados en polietilenglicol (PEG) 2000 y sales para restos de cizallado de chapas de eucalipto..... | 44 |
| 3.2.2 Estudio de ATPS basados en Etanol y Sales para restos de cizallado de chapas de eucalipto | 45 |
| 3.2.3 Estudio de ATPS basados en PEG de peso molecular variable y (NH ₄) ₂ SO ₄ para aserrín de eucalipto | 46 |
| 3.2.4 Estudio de ATPS basados en Etanol y (NH ₄) ₂ SO ₄ para aserrín de eucalipto..... | 47 |
| 3.2.5 Estudio de ATPS basados en Tween 20 y dihidrógeno citrato de colina (ChDHC) para paja de trigo..... | 48 |
| 3.2.5.1 <i>Determinación de los datos de equilibrio</i> | 48 |
| 3.2.5.2 <i>Procedimiento de extracción y separación</i> | 48 |
| 3.2.6 Determinación del coeficiente de reparto (K) y la eficiencia de extracción (%EE) | 49 |
| 3.3 Métodos analíticos..... | 50 |
| 3.3.1 Determinación del contenido en fenoles totales | 50 |
| 3.3.2 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en los extractos | 50 |
| 3.3.2.1 <i>Análisis por HPLC-ESI-TOF (“Cromatografía líquida de alta resolución- ionización por electrospray-tiempo de vuelo”)</i> | 50 |
| 3.3.2.2 <i>Análisis por HPLC-DAD (“Cromatografía líquida de alta resolución- acoplado a un detector de diodos”)</i> | 51 |
| 3.3.3 Evaluación de la actividad antioxidante | 51 |
| 3.3.3.1 <i>Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)</i> | 51 |
| 3.3.3.2 <i>Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil)</i> | 52 |
| 3.3.3.3 <i>Método ABTS ((2,2'-azino-di(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico))</i> | 53 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 55 |
| 4.1 Extracción de compuestos fenólicos de restos de cizallado de chapas de eucalipto..... | 57 |
| 4.1.1 Estudio de la extracción con ATPS basados en PEG 2000+sales | 57 |
| 4.1.1.1 <i>Influencia del tiempo de sedimentación en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición</i> | 57 |
| 4.1.1.2 <i>Influencia de la temperatura en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición</i> | 58 |
| 4.1.1.3 <i>Influencia de la sal inorgánica en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición</i> | 59 |
| 4.1.1.4 <i>Influencia de la composición de la alimentación en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición</i> | 61 |

| | |
|---|----|
| 4.1.1.5 Influencia del tiempo de extracción en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición..... | 62 |
| 4.1.1.6 Influencia de la relación sólido/líquido en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición..... | 63 |
| 4.1.1.7 Caracterización de los extractos por espectroscopia de masas HPLC-ESI-TOF | 64 |
| 4.1.2 Estudio de la extracción con ATPS basados en etanol+sales | 67 |
| 4.1.2.1 Influencia del tiempo de sedimentación en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición..... | 67 |
| 4.1.2.2 Influencia de la sal inorgánica en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición | 68 |
| 4.1.2.3 Influencia de la longitud de la recta de reparto en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición | 69 |
| 4.1.2.4 Influencia de la relación de volumen en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición..... | 70 |
| 4.1.2.5 Influencia de la temperatura en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición | 71 |
| 4.1.2.6 Caracterización de los extractos por espectroscopia de masas HPLC-ESI-TOF | 73 |
| 4.2 Extracción de compuestos fenólicos a partir de aserrín eucalipto | 74 |
| 4.2.1 Estudio de la extracción con ATPS basados en PEG+(NH ₄) ₂ SO ₄ | 74 |
| 4.2.1.1 Influencia de la longitud de la recta de reparto y el peso molecular del PEG en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición | 74 |
| 4.2.2 Estudio de la extracción con ATPS basados en etanol+(NH ₄) ₂ SO ₄ | 75 |
| 4.2.2.1 Influencia de la longitud de la recta de reparto en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición | 75 |
| 4.2.2.2 Influencia de la relación de volumen en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición..... | 76 |
| 4.2.2.3 Influencia de la relación sólido/líquido en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición..... | 77 |
| 4.2.2.4 Influencia de la temperatura en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición | 78 |
| 4.3 Extracción de compuestos fenólicos a partir de paja de trigo | 78 |
| 4.3.1 Estudio de la extracción con ATPS basados en Tween 20+dihidrógeno citrato de colina (ChDHC)..... | 78 |
| 4.3.1.1 Determinación de los datos de equilibrio..... | 78 |
| 4.3.1.2 Partición de ácidos fenólicos | 82 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 89 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 95 |

| | |
|--|-----|
| LISTA DE PUBLICACIONES | 105 |
| LISTA DE COMUNICACIONES A CONGRESOS..... | 105 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Fig. 2.1. Esquema de reacción entre un radical peroxi y un compuesto fenolico. | 19 |
| Fig. 2.2 Estructura química de cuatro antioxidantes sintéticos. | 21 |
| Fig. 2.3. Estructura química de los isómeros de tocoferoles y tocotrienoles | 22 |
| Fig. 2.4 Estructura química de los flavonoides | 22 |
| Fig. 2.5. Algunos flavonoides y compuestos relacionados | 24 |
| Fig 2.6. Estructuras químicas de los ácidos fenólicos | 25 |
| Fig 2.7. Clasificación de los taninos..... | 25 |
| Fig 2.8. Reacción producida en el ensayo FRAP | 27 |
| Fig 2.9. Curva binodal | 35 |
| Fig. 3.1. Estructura de ChDHC..... | 49 |
| Fig. 3.2 Curva de calibración de ácido gálico utilizada para determinar el contenido total de fenoles..... | 50 |
| Fig. 3.3 Curva de calibración de ácido ascórbico para la determinación del poder antioxidante en la reducción del hierro (FRAP) | 52 |
| Fig. 3.4 Curva de calibración de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox de los extractos. Método DPPH..... | 53 |
| Fig. 3.5 Curva de calibración de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox de los extractos. Método ABTS..... | 53 |
| Fig. 4.1. Coeficiente de reparto, K, y rendimiento total de fenoles en los ATPS basados en PEG 2000/sal bajo las siguientes condiciones de extracción (temperatura de extracción, 65°C; tiempo de sedimentación, 1h; S/L, 1:10). | 61 |
| Fig 4.2. Coeficiente de reparto, K, en distintos PEG2000/sal ATPS en función de la longitud de la recta de reparto (LRR) (temperatura de extracción, 65°C; tiempo de sedimentación, 1 h; S/L, 1:10)..... | 63 |
| Fig 4.3. Cromatograma HPLC de los extractos de eucalipto en la fase superior bajo las siguientes condiciones: S/L, 1:10; temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h; Sistema 1 (PEG 2000/(NH ₄) ₂ SO ₄) . | 67 |
| Fig 4.4. Cromatograma HPLC de los extractos de eucalipto en la fase superior bajo las siguientes condiciones: S/L, 1:10; temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h; Sistema 5 (PEG 2000/(K ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄)) | 67 |
| Fig 4.5. Cromatograma HPLC de los extractos de eucalipto en la fase superior bajo las siguientes condiciones: S/L, 1:10; temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h; Sistema 12 (PEG 2000/Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇). | 68 |
| Fig. 4.6. Coeficiente de reparto, K, en distintos etanol/sal ATPS en función de la longitud de la recta de reparto (LRR) (temperatura de extracción: 25°C; tiempo de extracción: 90 min; tiempo de sedimentación: 1 h; S/L, 1:10)..... | 70 |

| | |
|---|----|
| Fig 4.7. Eficiencia de extracción de fenoles, %EE, en los distintos ATPS basados en etanol/sal en función de la relación de volúmenes V_r (temperatura de extracción, 25°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h; S/L, 1:10). | 71 |
| Fig 4.8. Rendimiento total de fenoles y capacidad antioxidante FRAP bajo las siguientes condiciones (temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h; S/L, 1:10). Sistema 5 (etanol/(NH ₄) ₂ SO ₄). | 72 |
| Fig 4.9. Cromatograma HPLC de los extractos de eucalipto en la fase superior bajo las siguientes condiciones: S/L, 1:10; temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h; Sistema 5 (etanol/(NH ₄) ₂ SO ₄) | 73 |
| Fig 4.10. Coeficiente de reparto, K, en los distintos ATPS basados en PEG/(NH ₄) ₂ SO ₄ en función de la longitud de la recta de reparto (LRR) y peso molecular del polímero (MW) (temperatura de extracción: 25°C; tiempo de sedimentación: 1 h, S/L 1:10) | 75 |
| Fig. 4.11. Rendimiento total de fenoles y eficiencia de extracción basados en etanol+(NH ₄) ₂ SO ₄ . Sistema 3 y 4.(temperatura de extracción, 25°C , tiempo de sedimentación, 1 h; S/L, 1:10, tiempo de extracción 90 min) | 77 |
| Fig 4.12. Diagrama de fases para el sistema Tween 20 (1)+ ChDHC (2)+ H ₂ O (3) a T = 20°C (□), 40°C (∇), 50°C (○) y 60°C (Δ) a P=101.3 KPa. | 81 |
| Fig 4.13. Curvas de solubilidad experimental y su correlación del sistema formado por Tween 20 (1)+ ChDHC (2)+ H ₂ O (3) a T = 20°C (□), 40°C (Δ), 50°C (○), 60°C (Δ) y P=101,3 kPa. | 83 |
| Fig. 4.14. Rectas de reparto (líneas sólidas) para el sistema Tween 20 (1)+ ChDHC (2)+ H ₂ O (3) a T = 20°C (□), T = 40°C (∇) , T = 50°C (○) y T = 60°C (Δ). | 84 |
| Fig.4.15. Cromatograma HPLC del HBN | 85 |
| Fig 4.16. Curva de solubilidad experimental de Tween 20 (1) + ChDHC (2)+ H ₂ O (3) (□) y Tween 20 (1)+ ChDHC (2)+ HBN (4) (○) a T = 20°C | 86 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 3.1 | 45 |
| Composición de alimentación seleccionada para los ATPS basados en PEG 2000 y sales. Datos a 25°C. | 45 |
| Tabla 3.2 | 46 |
| Composición de alimentación seleccionada para los ATPS basados en Etanol y sales. Datos a 25°C. | 46 |
| Tabla 3.3 | 47 |
| Composición de alimentación seleccionada para los sistemas ATPS basados en PEG y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Datos a 25°C | 47 |
| Tabla 3.4 | 47 |
| Composición de alimentación seleccionada para los sistemas ATPS basados en Etanol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Datos a 25°C. | 47 |
| Tabla 3.5 | 49 |
| Composición de alimentación seleccionada para los sistemas ATPS basados en Tween 20 y ChDHC. Datos a 20 °C | 49 |
| Tabla 4.1 | 58 |
| Influencia del tiempo de sedimentación en la recuperación y partición de fenoles en los ATPS basados en PEG 2000 y sal. (temperatura, 45°C; S/L, 1:10; tiempo de extracción, 90 min) | 58 |
| Tabla 4.2 | 59 |
| Rendimiento total de fenoles y constante de reparto en función de la temperatura (tiempo de sedimentación, 1 h; S/L, 1:10; tiempo de extracción, 90 min)..... | 59 |
| Tabla 4.3 | 63 |
| Rendimiento total de fenoles en función de la composición de la alimentación (tiempo de sedimentación, 1 h; temperatura, 65°C; S/L, 1:10; tiempo de extracción, 90 min)..... | 63 |
| Tabla 4.4 | 64 |
| Rendimiento total de fenoles en función del tiempo de extracción (tiempo de sedimentación, 1 h; temperatura de extracción, 65°C; S/L, 1:10) | 64 |
| Tabla 4.5 | 65 |
| Rendimiento total de fenoles en función de la relación S/L (tiempo de sedimentación, 1 h; temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción 90 min)..... | 65 |
| Tabla 4.6 | 66 |
| Compuestos fenólicos identificados en los extractos de madera de eucalipto en la fase superior para los Sistemas basados en PEG2000/sal en las siguientes condiciones (S/L, 1:10; temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h)..... | 66 |

| | |
|---|----|
| Tabla 4.7 | 69 |
| Influencia del tiempo de sedimentación en la recuperación y partición de fenoles en los ATPS basados en etanol-sal. (temperatura de extracción, 25°C ; S/L, 1:10; tiempo de extracción, 90 min) | 69 |
| Tabla 4.8 | 72 |
| Rendimiento total de fenoles y constante de reparto en función de la temperatura (tiempo de sedimentación, 1 h; S/L, 1:10; tiempo de extracción, 90 min)..... | 72 |
| Tabla 4.9 | 73 |
| Compuestos fenólicos identificados en extractos de madera de eucalipto en la fase superior para el sistema basado en etanol/(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sistema 5) en las siguientes condiciones (S/L, 1:10; temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h)..... | 73 |
| Tabla 4.10 | 75 |
| Influencia de la LRR en la partición de fenoles en los ATPS basados en PEG1000+(NH ₄) ₂ SO ₄ . (tiempo de sedimentación, 1 h; temperatura de extracción, 25°C; S/L, 1:10; tiempo de extracción, 90 min) | 75 |
| Tabla 4.11 | 76 |
| Influencia de la LRR en la capacidad antioxidante FRAP en los ATPS basados en PEG 1000+(NH ₄) ₂ SO ₄ . (tiempo de sedimentación, 1 h; temperatura de extracción, 25°C; S/L, 1:10; tiempo de extracción, 90 min) | 76 |
| Tabla 4.12 | 76 |
| Influencia de la longitud de la recta de reparto en la partición de fenoles en los ATPS basados en etanol+(NH ₄) ₂ SO ₄ (tiempo de sedimentación, 1 h; temperatura de extracción, 25°C ; S/L, 1:10; tiempo de extracción 90 min)..... | 76 |
| Tabla 4.13 | 77 |
| Influencia de la relación sólido/líquido en la partición de fenoles en los ATPS basados en etanol+(NH ₄) ₂ SO ₄ (tiempo de sedimentación, 1 h; temperatura de extracción, 25°C; tiempo de extracción 90 min; Sistema 5)..... | 77 |
| Tabla 4.14 | 78 |
| Influencia de la temperatura en la partición de fenoles y la capacidad antioxidante FRAP en los ATPS basados en etanol+(NH ₄) ₂ SO ₄ . (tiempo de sedimentación, 1 h; S/L 1:10; tiempo de extracción 90 min; Sistema 5) | 78 |
| Tabla 4.15. Datos de equilibrio para el Sistema ternario: Tween 20 (1) + ChDHC (2) + H ₂ O (3) desde 20 a 60°C | 80 |
| Tabla 4.16. Parámetros de ajuste y la desviación estándar de la ecuación 4.1 del sistema ternario Tween 20 (1) + ChDHC (2) +H ₂ O (3) desde 20 a 60°C | 81 |
| Tabla 4.17. Parámetros de ajuste y la desviación estándar de la ecuación 4.2 del sistema ternario Tween 20 (1) + ChDHC (2) +H ₂ O (3) desde 20 a 60°C | 82 |
| Tabla 4.18. Parámetros de ajuste y la desviación estándar de la ecuación 4.3 del sistema ternario Tween 20 (1) + ChDHC (2) +H ₂ O (3) desde 20 a 60°C | 82 |

| | |
|--|----|
| Tabla 4.19. Composición de las recta de reparto para el sistema ternario Tween 20 (1) + ChDHC (2) + H ₂ O (3) desde 20 a 60°C | 83 |
| Tabla 4.20. Composición en ácidos fenólicos, rendimiento total de fenoles (TPY), actividad antioxidante DPPH y ABTS en el hidrolizado neutralizado (HBN)..... | 85 |
| Tabla 4.21. Rendimiento total de fenoles y eficiencia de extracción de fenoles a diferentes temperaturas de extracción. | 87 |
| Tabla 4.22. Influencia de la composición de la alimentación en la extracción y partición del ácido <i>p</i> -cumárico | 87 |
| Tabla 4.23 Influencia de la composición de alimentación en la extracción y partición del ácido ferúlico | 87 |
| Tabla 4.24. DPPH, ABTS, rendimiento total de fenoles y eficiencia de extracción a diferentes composiciones de la alimentación | 88 |





RESUMEN

Los materiales lignocelulósicos, dentro de las fuentes de biomasa, son considerados como una prometedora materia prima para la producción de combustibles y productos químicos dado que son abundantes, fácilmente disponibles y no compiten con la producción de alimentos como otras matrices. Los materiales lignocelulósicos tienen como componentes principales, la lignina, la celulosa y las hemicelulosas, además de otros componentes minoritarios como proteínas, compuestos extraíbles y minerales inorgánicos. La utilización eficiente de estos materiales implica el fraccionamiento de los mismos y su posterior conversión en productos de alto valor añadido. En particular, en este trabajo se plantea la recuperación de los compuestos fenólicos con potencial actividad antioxidante presentes en diversos materiales lignocelulósicos.

El método más empleado para la separación de compuestos fenólicos de los productos naturales es la extracción con disolventes orgánicos y tanto el rendimiento de extracción como la actividad antioxidante de los extractos son fuertemente dependientes del disolvente. Aunque este proceso es eficiente y algunos de los disolventes empleados como el etanol son considerados disolventes GRAS (generalmente reconocidos como seguros), los extractos obtenidos con otros disolventes pueden no ser seguros para el consumo humano debido a los posibles efectos tóxicos de los mismos. Por lo tanto, la selección del disolvente es una variable importante y así, uno de los objetivos de la química e ingeniería verde es desarrollar alternativas de extracción que no involucren disolventes orgánicos. En este contexto, los sistemas acuosos de dos fases (ATPS) se han utilizado para la separación de muchos biomateriales.

La extracción y purificación de moléculas con sistemas acuosos de dos fases (ATPS) es una técnica que tiene diversas ventajas sobre la extracción convencional. Es ambientalmente aceptable por su alto contenido en agua en ambas fases, la tensión superficial entre ambas fases es baja, lo que permite una alta transferencia de masa. El hecho de que ambas fases sean acuosas y tengan una tensión interfacial baja, proporciona un medio tal que permite que las biomoléculas y partículas celulares puedan repartirse entre las fases conservando su actividad. Por lo tanto, tiene baja degradación de biomoléculas, es fácil de operar, el coste de materiales es bajo y hay la posibilidad de recuperar el polímero y la sal. Además, es fácilmente escalable y el cambio de escala puede realizarse a partir de datos de laboratorio en forma confiable, dado que el coeficiente de partición no varía con el cambio de escala.

Los ATPS se forman cuando dos compuestos solubles en agua superan una concentración crítica y como consecuencia se forman dos fases. Tradicionalmente, los ATPS más comunes son los formados por polímero-polímero o polímero-sal. En particular, los ATPS formados por polímero y sal tienen diversas ventajas como su bajo coste, baja viscosidad y bajo tiempo en la separación de fases, entre otras. Aunque en la actualidad se han estudiado otras alternativas de ATPS para recuperar una gran variedad de biomoléculas como son los formados por alcohol-sal, líquido iónico y surfactantes. Los ATPS formados por etanol y sal son de bajo coste y tienen la ventaja de que permiten la recuperación del alcohol por evaporación o destilación. La aparición de

RESUMEN

líquidos iónicos ha abierto el camino para el desarrollo de nuevos tipos de ATPS, en combinación con sales, polímeros y surfactantes. Los líquidos iónicos se han definido comúnmente como sales orgánicas cuya temperatura de fusión está por debajo de 100°C y tienen características tales como su poca volatilidad, su alta capacidad de solvatación y alta estabilidad térmica.

El objetivo general de este trabajo es la recuperación de los compuestos fenólicos presentes en diferentes residuos agroforestales mediante el empleo de sistemas acuosos de dos fases (ATPS) como alternativa a los procesos convencionales de extracción con disolventes orgánicos. Estos compuestos podrán ser fuente de productos de alto valor de interés para las industrias farmacéuticas, de alimentos funcionales o cosmética. La obtención de compuestos fenólicos, se realizó mediante el aprovechamiento de diferentes residuos agroforestales: restos de cizallado de chapas de *Eucalyptus globulus*, aserrín de *Eucalyptus grandis* y paja de trigo. De este modo se consigue la valorización de residuos, en la actualidad infrautilizados, y sustituir los disolventes habitualmente empleados por sustancias que se ajusten mejor a los principios vigentes sobre sostenibilidad y ecoeficiencia.

En una primera fase se estudió la recuperación de compuestos fenólicos a partir de restos de cizallado de *Eucalyptus globulus* mediante dos tipos de ATPS. Por un lado, ATPS basados en polietilenglicol (PEG 2000), agua y diferentes sales ((NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄, K₂HPO₄-KH₂PO₄ y Na₃C₆H₅O₇), y por otro lado ATPS basados en etanol, agua y sales ((NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄ y K₂HPO₄-KH₂PO₄).

Para los ATPS basados en PEG 2000+sales+agua se estudió el efecto del tiempo de sedimentación, la temperatura, el tipo de sal inorgánica, la composición de alimentación, el tiempo de extracción y la relación sólido/líquido en la recuperación y partición de compuestos fenólicos. Además se identificaron los compuestos fenólicos extraídos mediante HPLC-ESI-TOF (cromatografía líquida de alta resolución-ionización por electrospray-tiempo de vuelo). En el estudio de los ATPS basados en etanol+sales+agua se estudió la influencia del tiempo de sedimentación, el tipo de sal inorgánica, la longitud de la recta de reparto (LRR), la relación de volúmenes de las fases y la temperatura sobre la recuperación y partición de compuestos fenólicos. Además se evaluó la capacidad antioxidante FRAP de los extractos y se identificaron los compuestos fenólicos extraídos mediante HPLC-ESI-TOF. Para todos los sistemas estudiados se determinaron los rendimientos de extracción en fenoles totales (TPY) y los coeficientes de reparto (K).

Se demostró la capacidad de los ATPS estudiados para extraer compuestos fenólicos a partir de restos de cizallado de madera de *Eucalyptus globulus* y se concluyó que con los sistemas basados en etanol+sales+agua se logran rendimientos de extracción en fenoles totales (0,40-5,36 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/ 100 mg madera en base seca (b.s)) superiores a los obtenidos con los sistemas basados en PEG (0,52-1,89 mg EAG/ 100 mg madera b.s) en todas las condiciones ensayadas. El contenido mayor en fenoles, 5,36 mg EAG/100 mg madera b.s, se obtuvo usando un ATPS formado con 40,6% (g/g) de etanol y con un 12% (g/g) de sulfato de amonio a 65°C. Sin embargo, los valores obtenidos de los coeficientes de reparto (K) con los sistemas basados en etanol (0,2-2,31) son inferiores a los de los sistemas basados en PEG 2000 (14,2-117). El

mayor valor de K se obtuvo con el sistema ATPS formado con 16,4% (g/g) de PEG 2000 y con un 15,21% (g/g) de sulfato de amonio a 65°C.

Para los ATPS estudiados se observó que el TPY aumenta con el aumento de la relación de volúmenes, del tiempo de extracción y con la disminución de la relación sólido-líquido. Además, el rendimiento de extracción se ve favorecido con la disminución del pH. Por otro lado, la temperatura incrementa el TPY pero disminuye el coeficiente de reparto. Se confirmó la presencia de compuestos fenólicos con potencial actividad antioxidante en los restos de cizallado de chapas de eucalipto, siendo el más abundante el ácido elágico.

En el caso particular de los sistemas basados en PEG+sales+agua los compuestos fenólicos tienen preferencia por la capa rica en PEG ($K > 1$), y se encontró que se obtienen mayores rendimientos de extracción en fenoles cuando se trabaja con una alta relación de polímero/sal, debido al aumento de la hidrofobicidad de la capa rica en PEG. Con los sistemas basados en etanol+sales+agua, se vio que la migración de los compuestos fenólicos a la capa superior o inferior es fuertemente dependiente del tipo de sal utilizada y que el rendimiento de extracción en fenoles aumenta con la LRR.

Posteriormente, el objetivo se centró en la recuperación de compuestos fenólicos a partir de aserrín de *Eucalyptus grandis* mediante dos tipos de ATPS: los basados en PEG, agua y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y los basados en etanol, agua y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La selección de la sal se basó en el estudio previo con los restos de cizallado de madera de eucalipto, eligiéndose la que condujo a los mayores valores de K y altos rendimientos en fenoles totales.

Para los ATPS basados en PEG+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +agua se estudió el efecto del peso molecular (MW) del polímero y la LRR en la recuperación y partición de compuestos fenólicos. Por otro lado, en los sistemas formados por etanol+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +agua las variables estudiadas fueron: LRR, la relación sólido/líquido, la relación de volúmenes y la temperatura en la recuperación y partición de compuestos fenólicos. Además, se evaluó la capacidad antioxidante FRAP de los extractos.

Se confirmó la capacidad de los sistemas PEG+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +agua y etanol+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +agua para extraer y fraccionar parcialmente los compuestos fenólicos presentes en el aserrín. Los compuestos fenólicos migraron hacia las capas ricas en polímero y en etanol, para los sistemas basados en PEG y etanol, respectivamente. Los valores de K en los sistemas basados en PEG variaron entre 33,2 a 66,6 mientras que los sistemas basados en etanol, los valores de K variaron entre 8,3 a 12,1.

Para los sistemas basados en PEG, el rendimiento total en fenoles varió entre 0,40 a 0,70 mg EAG/ 100 mg madera b.s. y para los sistemas basados en etanol, el rendimiento total en fenoles varió desde 0,75 a 0,89 mg EAG/ 100 mg madera b.s., cuando la extracción se llevó a cabo a 25°C. Nuevamente, el contenido mayor en fenoles, 0,89 mg EAG/ 100 mg madera b.s, se obtuvo usando el ATPS formado con 40,6% (g/g) de etanol y con un 12% (g/g) de sulfato de amonio a 25°C, con una capacidad antioxidante FRAP de 3605 mmol de equivalentes de ácido ascórbico (EAA)/100 mg madera b.s. Cuando la extracción se realizó a 65°C, se obtuvo un contenido total de fenoles de 1,30

RESUMEN

mg EAG/ 100 mg madera b.s y una capacidad antioxidante FRAP de 14486 mmol de EAA/100 mg madera b.s.

Se demostró para los sistemas basados en PEG que el peso molecular del polímero y la LRR tiene influencia en el TPY. Los valores más altos de TPY se obtuvieron con el menor MW y la mayor LRR, sin afectar la capacidad antioxidante FRAP.

En cuanto a los sistemas basados en etanol, se observó que al aumentar la relación de volúmenes, la temperatura y la LRR el TPY aumenta. Por otro lado, al aumentar la temperatura, el coeficiente de reparto disminuye.

Finalmente, se evaluó la capacidad de un ATPS formado por Tween 20 (Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano), agua y un líquido iónico biocompatible (dihidrógeno citrato de colina (ChDHC)) para la extracción de ácidos fenólicos y la partición de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico a partir de un hidrolizado de la paja de trigo (WS). El hidrolizado fue obtenido a través de un tratamiento secuencial de la paja de trigo con ácido y álcalis, que permite fraccionar los materiales lignocelulósicos en celulosa, lignina y hemicelulosas. Se estudió la influencia de la temperatura y la composición de la alimentación en la partición de los componentes. Se determinó en los extractos la actividad antioxidante DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) y ABTS (2,2'-azino-di(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico). Además, se determinó el contenido total de fenoles y se identificaron los compuestos mediante HPLC+DAD (cromatografía líquida de alta resolución-acoplado a un detector de diodos).

Como paso previo fue necesaria la obtención de los datos de equilibrio para el ATPS seleccionado. Para ello, se evaluó la existencia de zonas bifásicas en el sistema ternario seleccionado desde 20°C hasta 60°C para determinar los rendimientos de extracción y los coeficientes de reparto de los ácidos fenólicos. Se comprobó la capacidad del surfactante Tween 20 y el líquido iónico ChDHC para formar ATPS a 20, 40, 50 y 60°C y se demostró que la región inmiscible aumenta con la temperatura. Los datos experimentales obtenidos se ajustaron a un modelo.

Se obtuvieron altos valores del rendimiento de extracción (más del 97% del contenido total de fenoles, 89% de ácido ferúlico y 93% de ácido *p*-cumárico) con el ATPS preparado con la mayor concentración de Tween 20 (61,1% (g/g)). Además, para esa concentración de Tween 20, el contenido total de fenoles fue de 4,51 mg EAG / g de WS b.s., la actividad antioxidante ABTS de 4,26 μ moles equivalentes de Trolox (TRE)/g WS b.s y la actividad antioxidante DPPH fue de 0,458 μ mol TRE/g WS b.s.. En los sistemas estudiados se demostró que los compuestos fenólicos tienen preferencia por la capa rica en Tween 20 y que la eficiencia de extracción aumenta con la relación de volúmenes. Los valores de K variaron entre 2,76 a 6,13 para el ácido *p*-cumárico y entre 2,34 y 4,18 para el ácido ferúlico.

Por lo tanto, se demostró la aplicabilidad de los ATPS para la extracción de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico de la lignina de paja de trigo.

ABSTRACT

Among biomass sources, lignocellulosic materials are considered a promising raw material for the production of both fuels and chemical products, as they are abundant, easily available and are not demanded as food. Lignocellulosic compounds have cellulose, hemicellulose and lignin as their three main components and also other minor compounds such as proteins, extractable compounds and inorganic minerals. The efficient use of these materials involves the fractionation of these materials and their subsequent conversion into products with high added value. In particular, this work studies the recovery of phenolic compounds with potential antioxidant activity present in various lignocellulosic materials.

Extraction with organic solvents is the most common method for the isolation of phenolic compounds from natural products and both extraction yield and extract antioxidant activity are strongly dependent on the solvent used. Although this procedure is efficient and some of the solvents used such as ethanol are GRAS (generally recognized as safe), the extracts from other solvents are generally not safe for human consumption due to potentially toxic effects of residual solvents. Therefore, solvent selection is an important variable, thus, one of the goals of green chemistry and engineering is to develop alternative ways of extraction which not do involve organic solvents. In this context, aqueous two phase systems (ATPS) have been used for the separation of many biomaterials.

Aqueous two-phase extraction is a powerful method for the extraction and purification of biomolecules that has numerous advantages over conventional solvent extraction. It is an eco-friendly technique because of its high water content in both phases and it has the advantage of great mass transference due to low superficial tension. The fact that both phases are aqueous and that the interfacial tension is low guarantees the perfect environment for biomolecules and cell particles to spread among phases while keeping their activity. Therefore, ATPS provide low biomolecule degradation, are easy to operate, are affordable and, moreover, if salt and polymers are present, the possibility of recovering appears. It is also remarkable that they are easy to scale in a reliable manner in the laboratory, given that the partition coefficient is not altered by scaling.

The ATPS are formed when two water soluble compounds achieve a critical concentration leading to the formation of two phases. Traditionally, the most common ATPS were composed of two water-soluble polymers or a polymer and a salt. Particularly, polymer-salt systems have several advantages; namely: low price, low viscosity and short time for phase separation, among others. In recent years, alternative ATPS including alcohol-salt, ionic liquid and surfactants for recovery of biomolecules have been studied. ATPS formed by alcohol and salts are of low cost and allow an easy recovery of the alcohol by evaporation or distillation. The emergence of ionic liquids has led the way for the development of a new type of ATPS, in combination with salts, polymers and surfactants. These molten salts have been commonly defined as organic

ABSTRACT

salts whose melting temperature lie below 100°C and have features such as their almost null vapour pressure, high solvation ability and thermal stability that have been repeatedly acknowledged

The general goal of the present work was to recover phenolic compounds from various agro-forestry residues through alternative extraction methods replacing organic solvents, namely ATPS. These phenolic compounds can be relevant to pharmaceutical, food and cosmetic industries due to their antioxidant capacity. Phenolic compounds were extracted from several agro-forestry residues: trimmings of *Eucalyptus globulus* wood veneers, *Eucalyptus grandis* sawdust and wheat straw (WS). In this way, the valorization of these residues, at present underused, is attained. Besides, the classic solvents are replaced by substances that better adjust to the underlying principles of sustainability and eco-efficiency.

In a first stage, the recovery of phenolic compounds from trimmings of *Eucalyptus globulus* wood veneers was studied. Two types of ATPS are used: on one hand, ATPS based on PEG 2000, water and various inorganic salts ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ and $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), and, on the other hand, ATPS based on ethanol, water and various inorganic salts ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 and $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$).

For the ATPS based on PEG2000+salt+water, the influence of settlement time, temperature, type of inorganic salt, feed composition, extraction time and solid-liquid ratio on phenolic recovery and partition was studied. Furthermore, RP-HPLC–ESI-TOF mass spectrometry was used to identify the phenolic compounds in the extracts. For the ATPS based on ethanol+salts+water, the influence of settlement time, type of inorganic salt, tie lie length (LRR), volume ratio and temperature on phenolic recovery and partition was studied. FRAP antioxidant capacity of the extracts was also determined and RP-HPLC–ESI-TOF mass spectrometry was used to identify the phenolic compounds in the extracts. For all the ATPS studied total phenols yield (TPY) and partition coefficients (K) were determined.

The potential of the ATPS studied for phenols recovery from trimmings of *Eucalyptus globulus* wood veneers was demonstrated. It was concluded that substantially superior phenol content extraction performance is obtained with systems based on ethanol+sal+water (0.40-5.36 mg gallic acid equivalent (EAG)/ 100 mg of oven-dried (o.d.)) wood when comparing with systems based on PEG+salt +water (0.52-1.89 mg (EAG)/ 100 mg o.d. wood). The highest total phenols yield 5.36 mg EAG/ 100 mg o.d. wood) was obtained using ATPS formed by 40.6% (w/w) ethanol and 12% (w/w) of ammonium sulphate at 65°C. However, the partition coefficients (K) (0.2-2.31) for ethanol+salts+water based systems were lower than those for PEG 2000+salts+water based systems (14.2-117). The highest K was obtained using ATPS formed by 16.4% (w/w) PEG 2000 and 15.2% (w/w) of ammonium sulphate at 65°C.

It was observed that, for the ATPS under consideration, TPY increases with increasing volume ratio and extraction time and with decreasing solid-liquid ratio. Besides, extraction performance is improved with decreasing pH. On the other hand, the partition coefficient decreases with increasing temperature. The presence of phenolic compounds in trimmings of *Eucalyptus globulus* wood veneers was confirmed, being ellagic acid the most abundant one.

In the case of the PEG+salt+water based systems, the phenolic compounds have preference for the PEG rich phase ($K > 1$), and it was found that better extraction performance is obtained when working with high polymer/salt ratio. This is due to the increase of hydrophobicity in the PEG rich phase. In the case of ethanol+salts+water based systems it was found that migration of phenolic compounds to the bottom or top phase is highly dependent on the type of salt selected and extraction performance increases with increasing LRR.

In a second stage, the objective was to study the extraction and the partition behavior of phenolic compounds from *Eucalyptus grandis* sawdust using two different ATPS: one based on PEG, water and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and the other on ethanol, water and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The selection of the salt was based on previous experiments with trimmings of *Eucalyptus globulus* wood veneers. The salt which led to the highest K and high phenols recovery was selected.

For ATPS based on PEG+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +water the effect of the polymer molecular weight (MW) and the LRR on the extraction and the partition of phenolic compounds was evaluated. Regarding the ethanol+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +water ATPS, the influence of LRR, solid/liquid ratio, volume ratio and temperature on the extraction and partition of phenolic compounds was studied. Besides, the FRAP antioxidant capacity of the extracts was determined.

The capacity of the PEG+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +water and ethanol+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +water systems for the extraction and partition of phenolic compounds present in sawdust was confirmed. The phenolic compounds were found to migrate to the polymer rich phase and to the ethanol rich phase respectively. The partition coefficient (K) varied between 33.2 and 66.6 when ATPS based on PEG were employed. For the ethanol based systems, K varied between 8.3 and 12.1.

Total phenols yield varied between 0.40 and 0.70 mg EAG / 100 mg o.d. wood for the ATPS based on PEG 2000 and between 0.75 and 0.89 mg EAG / 100 mg o.d. wood for the systems based on ethanol. Again, the highest total phenols yield at 25°C, 0.89 mg EAG/ 100 mg o.d. wood, was obtained using the ATPS formed by 40.6% (w/w) ethanol and 12% (w/w) of ammonium sulphate. The extract FRAP antioxidant activity was 3605 mmol ascorbic acid equivalent (EAA) / 100 g o.d. wood under these conditions. At 65°C, a total phenols yield of 1.30 mg EAG/ 100 mg o.d. wood and a FRAP antioxidant activity of 14486 mmol EAA / 100 g o.d. wood were attained.

For the PEG based systems it was found that polymer molecular weight and LRR influence the TPY. The highest TPY values were obtained with the lowest MW and the greatest LRR, without affecting the FRAP antioxidant capacity.

Regarding the ethanol based systems, TPY increased with increasing temperature, LRR and volume ratio. In addition, the partition coefficient decreased with increasing temperature.

Finally, the ability of an ATPS composed of a cholinium-based ionic liquid containing the biodegradable and non-toxic anion dihydrogencitrate (ChDHC) and Tween 20 (Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate) for the extraction of phenolic acids and partition of *p*-coumaric and ferulic acids from a WS hydrolysate was

ABSTRACT

evaluated. The hydrolysate was obtained through a sequential treatment of WS with acid and alkaline that allows the fractionation of the lignocellulosic material into cellulose, hemicellulose and lignin. Moreover, the influence of the temperature and feed concentration on the partition of ferulic and *p*-coumaric acids was analyzed. Total phenols content, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-di(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) antioxidant activities of the extracts were determined and phenolic compounds were identified by HPLC-DAD.

For that, the existence of biphasic areas in model aqueous ternary systems from 20°C to 60°C was ensured as a prior step to evaluate the extraction yields and partition coefficients of ferulic and *p*-coumaric acids at different feed concentrations of the ATPS. The present work has demonstrated the suitability of a completely biocompatible platform consisting of ChDHC and Tween 20 to generate immiscibility windows in aqueous solutions at temperatures from 20 to 60°C. A slight increase in the total biphasic area was found when increasing temperature. After having mapped the tie-lines and binodal curves, data were suitably modelled by fitting to mathematical equations.

It was found that the surfactant content turned out to be a key parameter to attain high extraction levels of phenolic acids (up to 97% of total phenols, 89% of ferulic acid and 93% of *p*-coumaric acid at the greatest surfactant concentration (61.1% (w/w))). Furthermore, at this surfactant concentration the total phenols content (TPY) after extraction was 4.51 mg EAG / g of WS dry basis (d.b.), ABTS antioxidant activity, 4.26 μ mol equivalents of Trolox (TRE)/g WS d.b. and DPPH antioxidant activity, 0.458 μ mol TRE / g WS d.b. It was found that phenolics had preference for the top Tween-rich phase and the extraction efficiency increased with increasing volume ratio. The partition coefficient (K) varied from 2.76 to 6.13 for *p*-coumaric acid and from 2.34 to 4.18 for ferulic acid. Therefore, the application of the ATPS to the extraction of *p*-coumaric and ferulic acid from wheat straw lignin was demonstrated.



1.OBJETIVOS



El objetivo general de este trabajo es la obtención de productos de alto valor, compuestos fenólicos con actividad antioxidante, de interés para las industrias farmacéutica, de alimentos o cosmética, a través del uso de sistemas alternativos a los convencionales tales como los sistemas acuosos de dos fases (ATPS). Los compuestos fenólicos se obtendrán a partir del aprovechamiento de diferentes residuos agroforestales. Por un lado, dos residuos forestales, restos de cizallados de chapas de *Eucalyptus globulus* y aserrín de *Eucalyptus grandis*, suministrados por ASERPAL S.A (España) y URUFOR S.A (Uruguay) respectivamente. Por otro lado, un residuo agrícola, paja de trigo, suministrada por un proveedor de trigo en México. De este modo se conseguiría la valorización de estos residuos, en la actualidad infrutilizados, y sustituir los disolventes orgánicos habitualmente empleados por sustancias que se ajusten mejor a los principios vigentes sobre sostenibilidad y ecoeficiencia.

El trabajo se ha estructurado en tres líneas de actuación:

En la primera, se aborda el análisis de sistemas de extracción alternativos a los disolventes orgánicos que son aplicados a restos de cizallado de chapas de *Eucalyptus globulus*. Se llevará a cabo la extracción de compuestos fenólicos del residuo con dos tipos de ATPS: ATPS basados en polietilenglicol (PEG) 2000, agua y diferentes sales ((NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄, K₂HPO₄-KH₂PO₄ y Na₃C₆H₅O₇), y ATPS basados en etanol, agua y sales ((NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄ y K₂HPO₄-KH₂PO₄).

El objetivo específico de esta línea es evaluar la aplicación de los ATPS para la extracción de compuestos fenólicos con potencial actividad antioxidante a partir del residuo indicado. Para ello se analizará la influencia de los parámetros de operación sobre el rendimiento de extracción y el coeficiente de reparto de los compuestos fenólicos.

Para los ATPS basados en PEG2000+sal/es+agua se estudiará el efecto del tiempo de sedimentación, la temperatura, la sal inorgánica, la composición de la alimentación, el tiempo de extracción y la relación sólido/líquido en la recuperación y partición de compuestos fenólicos. Además se identificarán los compuestos fenólicos extraídos mediante cromatografía líquida de alta resolución-ionización por electrospray-tiempo de vuelo (HPLC-ESI-TOF).

En el estudio de los ATPS basados en etanol+sal/es+agua se estudiará el tiempo de sedimentación, la temperatura, la sal inorgánica, la longitud de la recta de reparto (LRR) y la relación de volúmenes de fase en la recuperación y partición de compuestos fenólicos. Por otro lado se evaluará la capacidad antioxidante FRAP de los extractos y se identificarán los compuestos fenólicos extraídos mediante HPLC-ESI-TOF.

En una segunda línea de actuación, el objetivo específico se centrará en evaluar la recuperación de compuestos fenólicos a partir de aserrín de eucalipto *grandis* mediante dos tipos de ATPS: los basados en PEG de peso molecular variable, agua y (NH₄)₂SO₄ y los basados en etanol, agua y (NH₄)₂SO₄. Para ello se analizará la influencia de los parámetros de operación sobre el rendimiento de extracción y el coeficiente de reparto de los compuestos fenólicos.

OBJETIVOS

Para los ATPS basados en PEG de peso molecular (MW) variable+(NH₄)₂SO₄+agua se estudiará la LRR y el efecto del MW del polímero en la recuperación y partición de compuestos fenólicos. Se seleccionaran tres polímeros diferentes, PEG1000, PEG2000 y PEG4000. También se evaluará la capacidad antioxidante FRAP de los extractos.

Por otro lado, en los sistemas formados por etanol+(NH₄)₂SO₄+agua las variables que se estudiarán son: LRR, la relación sólido/líquido, la relación de volúmenes y la temperatura en la recuperación y partición de compuestos fenólicos. Además se evaluará la capacidad antioxidante FRAP de los extractos.

Finalmente, en la tercera línea de actuación, se evaluará la capacidad de un ATPS formado por un tensoactivo, Tween 20 (Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano), agua y un líquido iónico biocompatible (dihidrógeno citrato de colina (ChDHC)) para la extracción de ácidos fenólicos a partir de la lignina obtenida por hidrólisis de la paja de trigo.

En esta etapa el objetivo específico es estudiar la partición de los ácidos *p*-coumárico y ferúlico mediante el ATPS formado por Tween 20+ ChDHC+agua a partir del hidrolizado de la paja de trigo, analizando la influencia de la temperatura y de la composición en la alimentación en la partición de dichos compuestos. Además se determinará el contenido total de fenoles de los extractos y su capacidad de inhibición de radicales libres DPPH y ABTS. Se identificarán y cuantificarán los ácidos *p*-coumárico y ferúlico mediante cromatografía líquida de alta resolución-acoplado a un detector de diodos (HPLC+DAD). Como paso previo a la extracción, se determinarán los datos de equilibrio para el sistema ternario a 20, 40, 50 y 60°C.



2. INTRODUCCIÓN



2.1 Los residuos lignocelulósicos

La sustitución de los recursos fósiles no renovables por materias primas sostenibles como la biomasa ha estado en el centro de atención durante los últimos años (Sehldon, 2014). Así, en este sentido, las estrategias de minimización de residuos deben ir de la mano con la valorización de los mismos (Tuck *et al.*, 2012). De esta forma la industria conseguirá tanto un aumento de los beneficios como un mejor desempeño ambiental (Vázquez *et al.*, 2008).

Dentro de las fuentes de biomasa, los materiales lignocelulósicos son considerados como materias primas prometedoras para la producción de combustibles y productos químicos dado que son abundantes, pueden crecer en suelos relativamente pobres, necesitan menos energía y nutrientes y no compiten con la producción de alimentos como otras matrices. Los compuestos lignocelulósicos tienen como componentes principales, la lignina, la celulosa y la hemicelulosa (van Heiningen *et al.*, 2011), por tanto pueden ser utilizados con fines comerciales para la producción de productos bio-activos con alto valor agregado. La obtención de antioxidantes a partir de diversos materiales de origen vegetal tales como vegetales diversos, frutos, residuos agro-industriales, hierbas, diversas partes de especies arbóreas (madera, corteza, hojas), es objeto de estudio desde hace años y su interés ha ido creciendo en la última década (Akpinar & Usal, 2015).

La industria forestal genera grandes cantidades de residuos de diferentes composiciones. Generalmente, estos residuos son quemados o desaprovechados, a pesar de que tienen muchos compuestos extraíbles que pueden ser recuperados. Así, muchos autores han publicado la presencia de compuestos fenólicos de bajo peso molecular con capacidad antioxidante (ácidos gálico, elágico y vainillínico y aldehídos siringílicos y sinápicos) en diferentes especies de eucaliptos (Conde *et al.*, 1996, Eyles *et al.*, 2003).

Dentro de los residuos agrícolas, la paja de trigo (WS) se considera como el segundo material lignocelulósico más abundante y fácilmente disponible, después de la paja de arroz (Kim *et al.*, 2004). Se han publicado diferentes trabajos sobre el fraccionamiento de los materiales lignocelulósicos en lignina, celulosa y hemicelulosas. En ellos se demuestra que la celulosa y la hemicelulosa se pueden transformar en azúcares fermentables para la producción de biocombustibles o convertirse en químicos como el furfural, xilitol y el ácido láctico (Romaní *et al.*, 2010; Moldes *et al.*, 2006). Aunque la lignina es un polímero rico en compuestos fenólicos, su conversión en productos de interés sigue siendo actualmente un reto (Kosa & Ragauskas, 2013).

Se ha reportado que el hidrolizado obtenido a partir de la deslignificación alcalina de la lignina de la WS, contiene ácidos fenólicos (ácido vainílico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido hidroxilbenzoico, ácido siringico) con propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, quimioprotectoras, etc. (Max *et al.*, 2010; Akpinar *et al.*, 2015).

Ya existen procesos comerciales de producción de extractos polifenólicos a partir de materiales de origen vegetal con diversas aplicaciones basadas en sus propiedades antioxidantes, como son el “Pycnogenol” (Horphang Research Ltd.) y el “Enzogenol”

INTRODUCCIÓN

(ENZO Nutraceuticals Limited), obtenidos a partir de las cortezas de *Pinus pinaster* y *Pinus radiata*, respectivamente.

En este contexto, en este trabajo se plantea la obtención de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante, a partir de tres residuos lignocelulósicos: restos de cizallado de chapas de *Eucalyptus globulus*, aserrín de *Eucalyptus grandis* y paja de trigo. Estos compuestos polifenólicos (ej.: ácido elágico, ácido gálico, catequina, etc) podrían ser utilizados en las industrias de alimentos, cosmética y farmacéutica (Max *et al.*, 2010; Dhamole *et al.*, 2013).

2.2 Los Antioxidantes

2.2.1 Características generales

La combustión biológica implicada en el proceso de respiración produce intermediarios dañinos para la salud llamados especies reactivas del oxígeno (ERO). Un exceso de ERO en el cuerpo puede dañar las proteínas, lípidos y DNA, resultado del llamado estrés oxidativo (Dudonné *et al.*, 2009). El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes, a favor de los oxidantes. Se cree que este desequilibrio causa envejecimiento y varias enfermedades en los humanos, por lo que un balance entre los antioxidantes y los oxidantes resulta crítico para mantener saludable a un sistema biológico (Dudonné *et al.*, 2009).

Un antioxidante es una sustancia que puede reducir eficientemente a un pro-oxidante con la formación de otros productos que tienen baja o no tienen toxicidad. Otra definición sugerida, es cualquier sustancia (sintética o natural) que cuando está presente a bajas concentraciones comparada con sustratos oxidables, retrasa o previene la oxidación de dicho sustrato. (Magalhaes *et al.*, 2008). Los mismos pueden estimular las defensas y ayudar a prevenir el daño celular. También los antioxidantes son ampliamente utilizados en la industria de los alimentos para prolongar la vida media de los alimentos (Dudonne *et al.*, 2009; Madhavi *et al.*, 1996).

De acuerdo con el reporte realizado por “Transparency Market Research” (‘Antioxidants Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2014-2020’), en 2013 el mercado global de antioxidantes tenía una tasa de crecimiento anual de 5,6 % y mueve US\$ 2123,4 millones. Se estima que para el 2020 el mercado llegará a aproximadamente US\$ 3111,5 millones. Con el actual aumento en la demanda de alimentos, medicinas y productos de cuidado personal, se estima que el uso de antioxidantes mantendrá esta tendencia creciente. El mercado actual de los antioxidantes incluye los naturales y los sintéticos. Dentro de los naturales están los extractos de romero, vitamina C, A y E. Por otro lado, el mercado de los antioxidantes sintéticos incluye al hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), propil galato (PG) y tert-butil hidroquinona (TBHQ). Aunque la seguridad de los antioxidantes sintéticos como aditivos ha sido comprobada aplicando diversos métodos de toxicidad, se ha referenciado la posible toxicidad de algunos de ellos como el BHA y BHT (Moure *et al.*, 2001; Moch, 1986), lo que unido a la cada vez mayor conciencia de los consumidores frente a la seguridad alimentaria ha fomentado las investigaciones para la búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes naturales más seguros.

2.2.2 Antioxidantes en alimentos

Muchos productos alimentarios sufren cambios en la matriz debido a la maduración, recolección, procesamiento primario y almacenamiento. La autooxidación de los lípidos es una de las principales causas del deterioro de los alimentos, lo que representa una pérdida económica para la industria alimentaria (Fennema, 1993). Esto se debe a que se generan sabores y olores desagradables, se reduce la vida útil de los alimentos y además se pueden generar productos tóxicos en la oxidación (Fennema, 1993).

Se denomina autooxidación cuando las moléculas lípidas reaccionan con oxígeno espontáneamente y forman radicales libres (Madhavi *et al.*, 1996). En general la función de los mismos es reducir la velocidad de iniciación de las reacciones en cadena por radicales libres y funcionan a muy bajas concentraciones, 0,01% o menos. Lo que no pueden hacer es revertir el proceso de oxidación o prevenir la rancidez hidrolítica (Madhavi *et al.*, 1996). Prolongan la vida útil de los alimentos y son capaces de inhibir la oxidación, reaccionando con radicales libres o productos primarios de la oxidación, y por tanto, son importantes para el sector de la bebida, alimentos, e industria cosmética (Madhavi *et al.*, 1996).

Los ácidos grasos poliinsaturados (ácidos grasos libres o triglicéridos, diglicéridos) y los fosfolípidos tienen el potencial para descomponerse mediante el mecanismo de autooxidación. Estas reacciones están catalizadas por la luz y por sustancias capaces de producir radicales libres. Las reacciones de oxidación ocurren en tres etapas, iniciación, propagación y terminación.

Se ha propuesto que la etapa de iniciación de la oxidación de los lípidos tiene lugar por descomposición de un hidroperóxido mediante un catalizador metálico o exposición a la luz. El oxígeno singulete es la especie activa implicada actuando como sensibilizadores la clorofila o mioglobina (Fennema, 1993; Pokorny *et al.*, 2001). La etapa de iniciación se da o por la abstracción de un radical de hidrógeno a un grupo alílico metileno de un ácido graso insaturado (RH) o la adición de un radical a un doble enlace:

Iniciación



Una vez formado un número suficiente de radicales libres, las reacciones en cadena se propagan. En reacciones de propagación, los radicales libres forman otros radicales. La formación de un radical es el responsable de la transformación de innumerables moléculas debido a eventos en cadena.

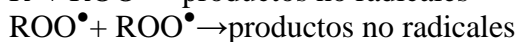
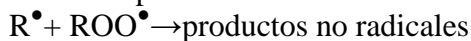
Propagación



INTRODUCCIÓN

Cuando hay una reducción de los ácidos grasos o lípidos insaturados, los radicales se unen para formar un compuesto estable no radicalario. Estas reacciones de terminación interrumpen las reacciones en cadena (Madhavi *et al.*, 1996).

Terminación



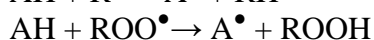
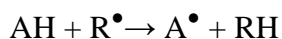
2.2.3 Clasificación de los antioxidantes

Existen diferentes formas de clasificar a los antioxidantes. Por un lado se los puede clasificar según su función, donde tenemos antioxidantes primarios, sinérgicos, misceláneos o secundarios. Por otro lado, es posible clasificarlos según la fuente de obtención (natural o sintética). También se los puede clasificar como polifenoles extraíbles (PE) y no extraíbles (PNE).

2.2.3.1 Clasificación de los antioxidantes según su función

Antioxidantes primarios

Los antioxidantes primarios (AH) donan protones o electrones a los radicales libres convirtiéndolos en productos más estables (ácido graso insaturado (RH), hidroperóxidos (ROOH)) por lo que terminan las reacciones en cadena. Retrasan o inhiben la etapa de iniciación reaccionando con radicales lípidos (R^{\bullet}) o inhibiendo la etapa de propagación reaccionando con un peroxi (ROO^{\bullet}) o alcoxi (RO^{\bullet}) radical. Además se forma un radical libre antioxidante (A^{\bullet}), que es más estable y menos reactivo. El radical libre antioxidante además puede interferir en las reacciones en cadena de propagación formando un compuesto peroxi antioxidante. También operan por adición en reacciones con radicales de lípidos formando complejos lípidos antioxidantes (Madhavi *et al.*, 1996).



Dentro de este grupo se encuentran los antioxidantes fenólicos (ej.: BHA, BHT, TBHQ y tocoferoles) y polihidroxifenólicos (ej.: galatos). También algunos compuestos fenólicos naturales como flavonoides, eugenol, vainillina y el extracto de romero tienen la capacidad de romper las reacciones en cadena. Hay que tener en cuenta que los antioxidantes primarios son efectivos a muy bajas concentraciones, mientras que a altos niveles se pueden convertir en prooxidantes (Madhavi *et al.*, 1996).

La reactividad de los compuestos fenólicos con el radical lipídico depende de los sustituyentes. Los compuestos fenólicos presentan muchos isómeros y diferentes agliconas, por lo tanto sus radicales intermedios son relativamente estables debido a la deslocalización por resonancia y a la falta de posiciones apropiadas para ser atacados

por el oxígeno molecular. Por ejemplo una reacción de un radical peroxi con un polifenol estéricamente impedido se presenta en la Fig. 2.1 (Madhavi *et al.*, 1996).

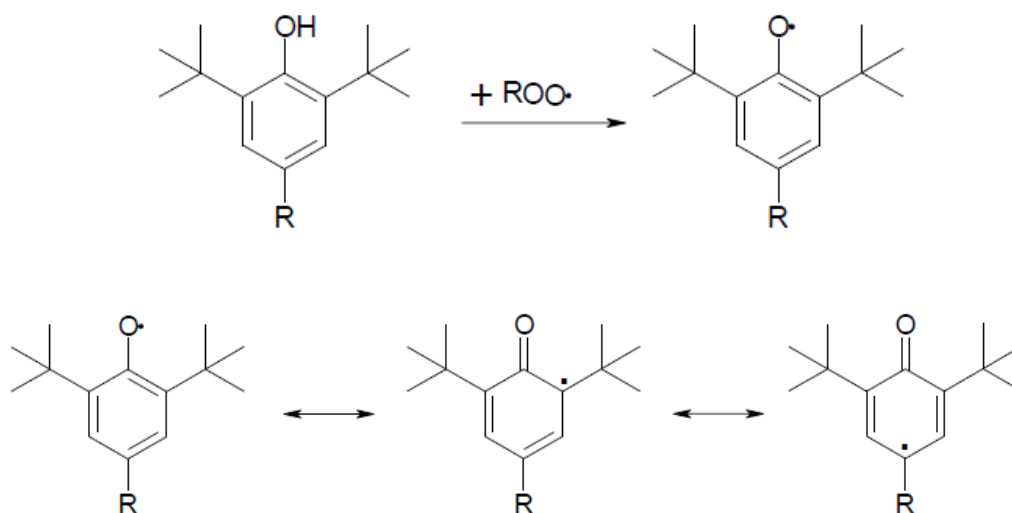


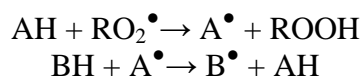
Fig. 2.1. Esquema de reacción entre un radical peroxi y un compuesto fenólico.

El radical fenoxi formado es más estable debido a su capacidad para formar numerosas formas mesómeras y se estabilizan adicionalmente mediante grupos voluminosos en la posición orto (Ver Fig. 2.1) (Madhavi *et al.*, 1996).

Antioxidantes sinérgicos

Se denomina sinergismo entre antioxidantes cuando una mezcla de antioxidantes tiene una actividad mayor que la suma de las actividades de cada uno utilizado por separado. Esto conlleva a tener una actividad antioxidante más eficiente usando menores concentraciones de cada uno de los antioxidantes individuales.

Se conocen diferentes tipos de sinergia: acción de aceptores de radicales libres mezclados y la acción combinada de un aceptor de radical libre y un quelante de metales. Si bien el mecanismo no está del todo comprendido, una explicación posible sería que si AH y BH son ambos aceptores de radicales libres mezclados y se supone que el BH reacciona más lentamente con el radical por impedimentos estéricos la reacción sería:



Así la presencia del BH da lugar a la regeneración del antioxidante primario. Un ejemplo de este sistema es la combinación de un antioxidante fenólico (antioxidante primario) con el ácido ascórbico (sinérgico). En este caso, el sinérgico dona hidrógenos al radical fenoxi (Fennema, 1993).

INTRODUCCIÓN

Además, el sinérgico puede tener más de un papel. El ácido ascórbico puede actuar como donador de electrones, quelante de metales, eliminador de oxígeno, etc. (Fennema, 1993). Otro modo de acción de los antioxidantes sinérgicos es estabilizar los antioxidantes primarios creando un medio ácido.

Los antioxidantes sinérgicos se pueden englobar en dos grupos: captadores de oxígeno y quelantes. Los captadores de oxígeno reaccionan con oxígeno libre eliminándolos en un sistema cerrado. Dentro de este grupo tenemos al ácido ascórbico, palmitato ascorbil, sulfitos y eritorbatos. El ácido ascórbico y ascorbil palmitato también actúan como sinérgicos con antioxidantes primarios (tocoferoles). Los quelantes son altamente efectivos tanto con los antioxidantes primarios como con los captadores de oxígeno. El ácido etildiaminotetracético, el ácido cítrico y los fosfatos están dentro de este grupo. Un par de electrones no compartidos en su estructura molecular promueve la acción de quelación. Forman complejos estables con metales pro-oxidantes como el cobre y el hierro, que promueven las reacciones de iniciación y aumentan considerablemente la energía de activación de las reacciones de iniciación. Los agentes acomplejantes de metales desactivan parcialmente las trazas de metal, presentes con frecuencia en forma de sales de ácidos grasos (Madhavi *et al.*, 1996). Las propiedades antioxidantes de un aceptor de radicales libres pueden intensificarse sustancialmente con la acción de un agente acomplejante que produce un efecto sinérgico (Fennema, 1993).

Antioxidantes secundarios

Los antioxidantes secundarios o preventivos reaccionan con los radicales hidroperóxidos, formando productos finales estables, no radicalarios, como por ejemplo alcoholes. Dentro de este grupo se encuentra el ácido tiodipropiónico y el dilauril tiodipropionato, además de tioésteres en general (Madhavi *et al.*, 1996).

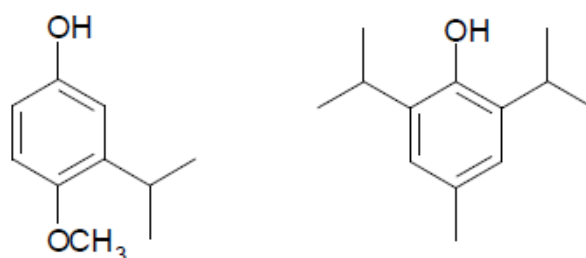
2.2.3.2 Clasificación de los antioxidantes según su fuente de obtención

Sintéticos

Los antioxidantes sintéticos más conocidos utilizados con frecuencia para prevenir el deterioro de los alimentos son: el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT), el ter-butilhidroxiquinona (TBHQ) y propil, octal y dodecil galatos (Fig. 2.2) (Madhavi *et al.*, 1996). La mayoría de los compuestos antioxidantes sintéticos, presentan estructuras fenólicas con diferentes grados de sustitución alquímica. Los antioxidantes sintéticos son muy usados como componentes estabilizadores de materiales como plásticos, gomas y polímeros y aditivos en la industria de alimentos.

El BHA y el BHT se utilizan en la industria de alimentos siendo ambos muy solubles en aceite. En los aceites vegetales presentan una baja actividad antioxidante, particularmente en aquellos ricos en antioxidantes naturales. La TBHQ es moderadamente soluble en aceite y ligeramente soluble en agua. La TBHQ se utiliza para suministrar estabilidad frente a la oxidación de los aceites poliinsaturados crudos y refinados y tienen como ventaja que no presenta problemas de color o estabilidad del aroma (Fennema, 1993).

4-metoxi-3-ter-butil fenol (3-BHA) 2,6-di-ter-butil-p-hidroxitolueno (BHT)



ter-butilhidroxiquinona (TBHQ) Propil galato (pG)

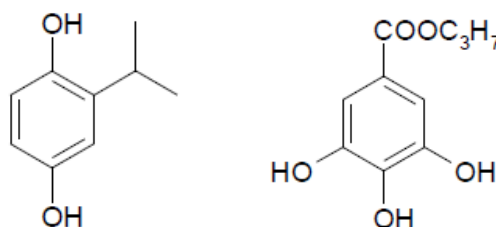


Fig. 2.2 Estructura química de cuatro antioxidantes sintéticos.

Naturales

Los antioxidantes naturales son encontrados en la mayoría de las plantas, microorganismos, hongos, y tejido animal. La mayoría de los antioxidantes naturales son compuestos fenólicos, y los grupos principales son: tocoferoles, flavonoides, ácidos fenólicos y taninos. Muchos antioxidantes naturales actúan atrapando radicales, quelando metales, y tienen diversas propiedades; antiinflamatorias, antialérgicas, anticarcinógenas, antihipertensivas, etc. (Max *et al.*, 2010).

Tocoferoles

Los tocoferoles son los antioxidantes más abundantes en la naturaleza y constituyen el principal antioxidante de los aceites vegetales. Las bajas concentraciones encontradas de tocoferoles en las grasas animales aparecen a partir de los vegetales de la dieta. Son clasificados en tocoferoles y en tocotrienoles y cada uno de estos casos tiene 4 isómeros (α -, β -, γ - y δ -) (Fig. 2.3) (Pokorny *et al.*, 2001). Se ha documentado que tienen actividad antioxidante principalmente debido al hidrógeno fenólicos en la posición C₆. El antioxidante más importante de este grupo es el α -tocoferol, que es el que tiene menos actividad antioxidante en los aceites comestibles que otros tocoferoles. Los tocoferoles actúan como antioxidantes donando el hidrógeno del grupo hidroxilo a un radical peroxi de origen lipídico. El radical formado del α -tocoferol se estabiliza a través de la deslocalización del electrón solitario en la estructura aromática (Pokorny *et al.*, 2001; Fennema, 1993).

INTRODUCCIÓN

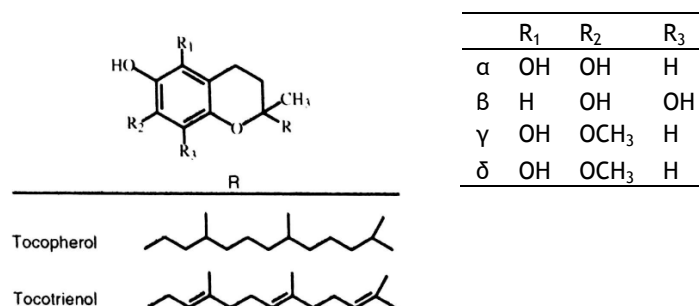


Fig. 2.3. Estructura química de los isómeros de tocoferoles y tocotrienoles

Flavonoides

Los flavonoides son uno de los grupos más ampliamente extendidos de metabolitos secundarios en plantas y se encuentran en prácticamente todas las partes de la misma. Su estructura química está basada en 15 átomos de carbono estructurados en tres anillos C₆-C₃-C₆. La estructura básica de estos compuestos consiste en dos anillos aromáticos (A y B) vinculados a una cadena alifática de carbonos, que muchas veces se condensa para formar anillos pirano (C) o menos común anillos furano. Se diferencian varios subgrupos según el modelo de sustitución del anillo C y la posición del anillo B (Figs. 2.4-2.5): flavonoles, flavanoles, flavonas, isoflavonas, antocianinas, chalconas y flavanonas, son los precursores comunes para los diferentes grupos. En general, los flavonoides están presentes en los tejidos de las plantas como glucósidos, y menos común como agliconas (C-OH, un flavonoide no unido a otra sustancia química) (Pokorny *et al.*, 2001; Madhavi *et al.*, 1996).

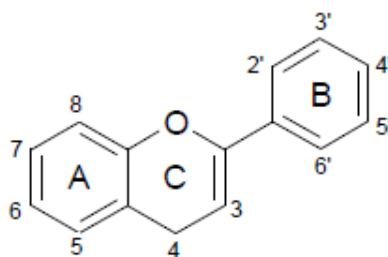


Fig. 2.4 Estructura química de los flavonoides

La habilidad de los flavonoides para inhibir la oxidación de los lípidos ha sido bien documentada y pueden actuar como antioxidantes por atrapamiento de radicales, que incluyen los aniones superóxidos, los radicales lipídicos peroxi, y los radicales hidroxil. Los flavonoides actúan también como antioxidantes mediante otros mecanismos de acción como son: inhibición del oxígeno singulete, quelación de metales o inhibición de las lipoxigenasas.

Los flavonoides con grupos hidroxilos libres, especialmente en el anillo B, aumentan la capacidad antioxidante. Como en otros compuestos fenólicos, la presencia y la posición del grupo hidroxil dicta la actividad antioxidante de los flavonoides. Los grupos hidroxilos del anillo B son los sitios activos principales en detener una oxidación en cadena.

También la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 3 y el doble enlace 2-3 en el anillo C parecen tener efecto en las propiedades antioxidantes (Pokorny *et al.*, 2001). Ejemplo de flavonoides comunes incluye la quercetina, el flavonol se encuentra en la cebolla, brócoli y la manzana, la catequina se encuentra en el té, etc. (Dai & Mumper, 2010).

Ácidos fenólicos

Los ácidos cinámicos y benzoicos están ampliamente relacionados con los flavonoides (Fig. 2.6). Se encuentran distribuidos en alimentos de origen vegetal. Usualmente se encuentran como ésteres o glucósidos. Dentro de los benzoicos, están al ácido gálico, el vainílico, sirínico, *p*-hidroxibenzoico, gentísico, etc.

Los derivados del ácido cinámico tienen mayor actividad antioxidante que los derivados de ácido benzoico. Dentro de los ácidos cinámicos, hay cuatro estructuras básicas que existen en forma natural y libre y corresponden a los ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico. El ácido cafeico es el ácido fenólico más abundante en frutas y vegetales, muchas veces esterificado con el ácido quínico. El ácido ferúlico también es abundante y está presente en los cereales, esterificado con hemicelulosas en la pared celular (Dai & Mumper, 2010). La posición y el grado de hidroxilación son de gran importancia a la hora de determinar la actividad antioxidante. Los monofenoles son menos eficientes que los polifenoles. La posición del grupo OH en la posición orto o para aumenta la actividad antioxidante. La combinación de dos ácidos fenólicos aumenta la eficiencia, por ejemplo el ácido rosmarínico es mejor antioxidante que el ácido cafeico. La esterificación del ácido cafeico con una azúcar baja la actividad, ej. el ácido clorogénico es menos efectivo que el cafeico (Pokorny *et al.*, 2001).

Taninos

Los taninos son metabolitos secundarios polifenólicos de las plantas. La definición clásica es que son compuestos hidrosolubles con masa molecular entre 300 y hasta 5000 Daltons y presentan las reacciones clásicas de los fenoles, la propiedad de precipitar alcaloides, gelatina y otras moléculas. Sin embargo esta definición no contempla a todos los taninos, existen moléculas de masas moleculares por encima de 20000 Daltons que se han aislado que deberían clasificarse como taninos debido a su estructura molecular. Otra definición es que son compuestos polifenólicos complejos, cuya característica fundamental es su alto peso molecular y se clasifican en hidrolizables y condensados. En esta definición se ignoran los taninos de bajo peso molecular y los taninos monoméricos, con masas moleculares por debajo de 1000 D (Khanbabaee & van Ree, 2001).

Por lo tanto es necesaria una definición que contemple a todos los taninos. Si nos basamos en la estructura molecular, definimos a los taninos como metabolitos secundarios polifenólicos de las plantas, y son tanto galoil ester y sus derivados, en donde los restos galoil o sus derivados están unidos a una variedad de núcleos de poliol, catequina y triterpenoides (galotaninos, elagitaninos y taninos complejos). También son las proantocianidinas oligoméricas y poliméricas que pueden poseer diferentes patrones de sustitución (taninos condensados). Por lo que se los puede clasificar en (galotaninos,

INTRODUCCIÓN

elagitaninos, taninos complejos y taninos condensados (Ver Fig 2.7) (Khanbabaee & van Ree, 2001).

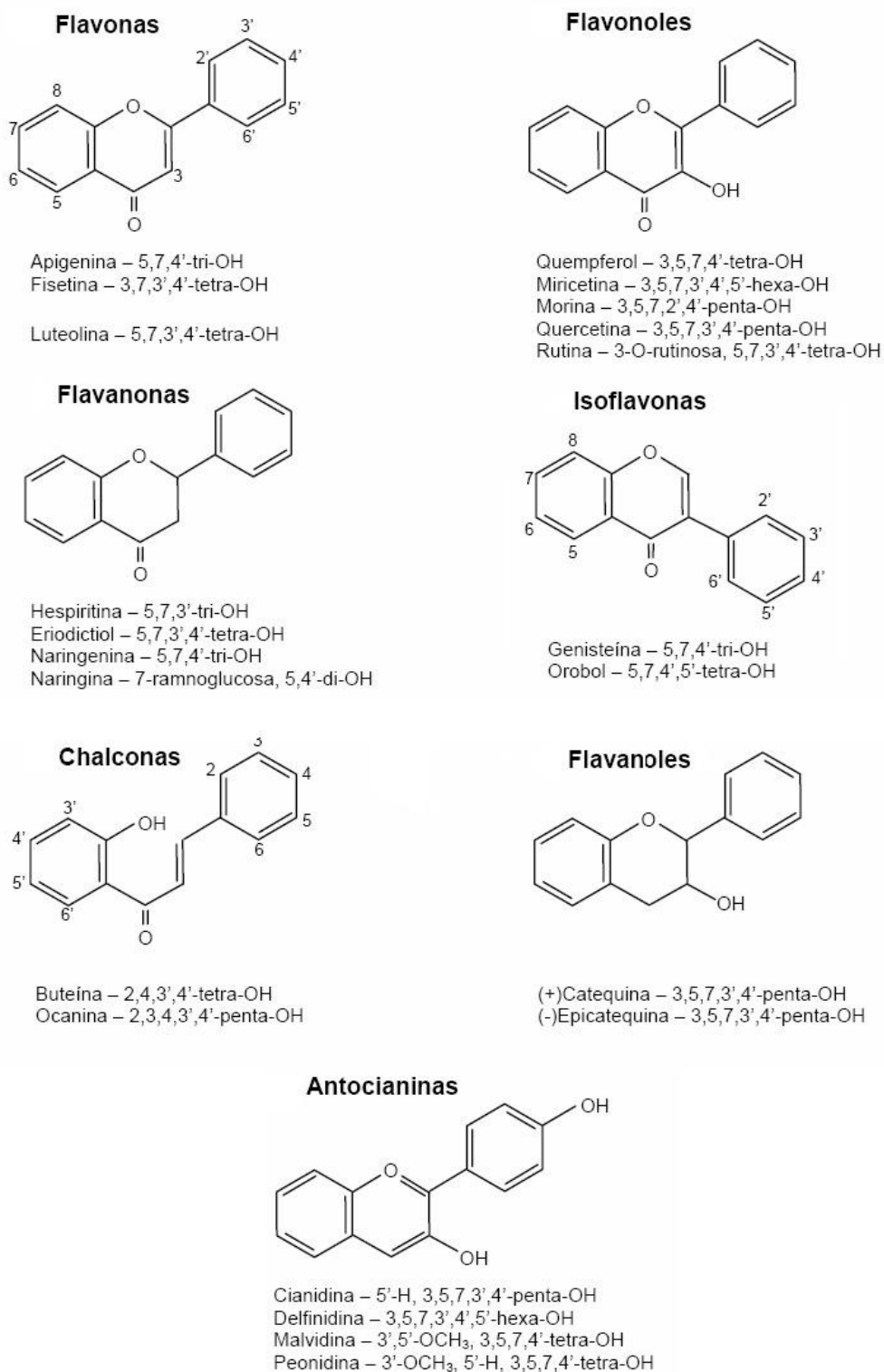
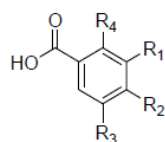


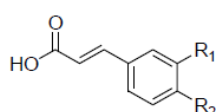
Fig. 2.5. Algunos flavonoides y compuestos relacionados

Derivados del ácido Benzoico



| R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | |
|------------------|----------------|------------------|----------------|-----------------|
| OH | OH | OH | H | Ácido gálico |
| H | H | OH | OH | Ácido gentísico |
| OCH ₃ | OH | OCH ₃ | H | Ácido vanílico |
| H | OH | OCH ₃ | H | Ácido siringico |

Derivados del Ácido Cinámico



| R ₁ | R ₂ | |
|------------------|----------------|--------------------------|
| OH | OH | Ácido cafeico |
| OCH ₃ | OH | Ácido ferúlico |
| H | OH | Ácido <i>p</i> -cumárico |

Fig 2.6. Estructuras químicas de los ácidos fenólicos

Los galotaninos y elagitaninos se los conoce también como taninos hidrolizables. Son hidrolizables en ácidos, álcalis y por enzimas. Son polímeros constituidos por un carbohidrato, generalmente glucosa, cuyos grupos hidroxilos se encuentran esterificados por ácidos fenólicos, como el ácido gálico para los galotaninos o el ácido elágico o su dímero de condensación para los elagitaninos (Dai & Mumper, 2010). Los taninos complejos, están constituidos por una unidad de galotanino o una unidad de elagitanino sumado a una unidad de catequina (Khanbabaee & van Ree, 2001).

Los taninos condensados se los conoce como proantocianidinas debido a que se descomponen a antocianidinas mediante una reacción de oxidación catalizada por ácido mediante calentamiento en disoluciones ácidas de alcohol (Dai & Mumper, 2010). Los taninos condensados están formado por unidades flavan-3-ol (catequina, epicatequina, epigallocatequina o epigallocatequina 3-O-galato).

Taninos

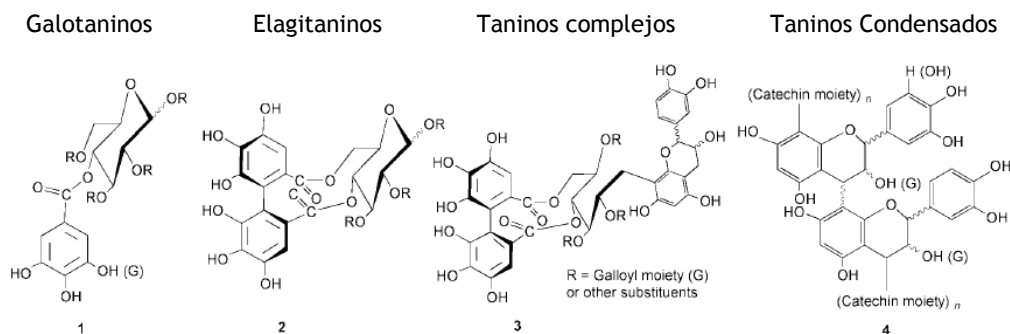


Fig 2.7. Clasificación de los taninos

INTRODUCCIÓN

2.2.3.3 Clasificación de los antioxidantes en polifenoles extraíbles (PE) y no extraíbles (PNE)

Los polifenoles se pueden clasificar en dos grupos: polifenoles extraíbles (PE) y los no extraíbles (PNE). Los PE son los que se disuelven normalmente en mezclas de agua y disolventes orgánicos y los PNE son lo que quedan retenidos en el residuo luego de la extracción (Arranz, 2010).

Como ejemplo de extraíbles se tienen los polifenoles de pesos moleculares bajos o medios (de monómeros a decámeros), ácidos fenólicos libres o esterificados, flavonoides y otras estructuras como proantocianidinas de bajo peso molecular (oligómeros de catequina y epicatequina con grado de polimerización entre 2 y 10) y taninos hidrolizables. Con respecto a los PNE se tienen también a los taninos hidrolizables, el ácido hexahidroxidifenico (HHDF), polifenoles hidrolizables (ácidos benzoicos y ácidos cinámicos que se unen a estructuras más complejas mediante enlaces glicosídicos) y taninos condensados.

2.2.4 Determinación de la actividad antioxidante. Métodos y clasificación.

Existe una gran variedad de compuestos fenólicos en plantas. Los métodos de separación y de análisis de estos compuestos de forma individual son costosos e ineficientes. Sumado a esto, el poder antioxidante de una mezcla compleja puede aumentar debido a su sinergia. Por lo tanto es imperioso establecer métodos de detección convenientes para la cuantificación rápida de la eficacia de los antioxidantes (Dai & Mumper, 2010).

Se han desarrollado diferentes métodos para medir la capacidad antioxidante total de antioxidantes no enzimáticos en muestras biológicas. Los ensayos en alimentos y sistemas biológicos son clasificados en dos grupos. Por un lado, los ensayos que evalúan la peroxidación de los lípidos usando como sustrato un lípido o una lipoproteína bajo condiciones estándares. En estos ensayos se mide el grado de inhibición de la oxidación en presencia de antioxidantes (ensayo Ácido tiobarbitúrico (TBA), ensayo Malonadehído/Cromatografía líquida de alta eficiencia (MA/HPLC), ensayo Malonadehído/cromatografía de gases (MDA/GC), ensayo de blanqueo β -caroteno o ensayo de dienos conjugados). Por otro lado, los ensayos que miden el grado de captura de los radicales libres (capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC), parámetro antioxidante de captura total de radicales libres (TRAP), poder antioxidante para la reducción del hierro (FRAP), ensayo de reducción de cobre (CUPRAC), ensayo 2,3 difenil-1- picrilhidracil (DPPH) y el ensayo 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico (ABTS)) (Prior *et al.* 2005, Singh & Singh , 2008). El método Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) también es considerado un ensayo para medir la capacidad antioxidante, debido a que el mecanismo básico se basa en una reacción de oxidación/reducción, aunque se ha usado este método durante años para medir el contenido total de fenoles (Dai & Mumper, 2010). A modo de ejemplo se detallan a continuación los ensayos aplicados en este trabajo.

2.2.4.1 Ensayos de captura de radicales libres

Los antioxidantes pueden desactivar los radicales libres por dos mecanismos distintos: los de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) o los de transferencia de un electrón (SET) (Prior *et al.* 2005). Dentro de los ensayos basados en HAT se encuentran el ORAC y el TRAP. Dentro de los ensayos basados en SET tenemos al FRAP y al CUPRAC. Por último los ensayos basados tanto en HAT como SET son el DPPH y el ABTS (Prior *et al.* 2005).

Método FRAP (Poder antioxidante para la reducción del hierro)

El ensayo mide directamente la habilidad del antioxidante en reducir el complejo de hierro férrico (Fe^{+3}) y TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) a Fe^{+2} -TPTZ (forma ferrosa) a pH bajo, donde este último es un complejo coloreado (Ver Fig. 2.8) (Prior *et al.*, 2005). Esta reducción es monitorizada midiendo el cambio de absorción a 593 nm. El poder reductor parece estar relacionado con el grado de hidroxilación y la extensión de la conjugación en los polifenoles. Este método no puede detectar compuestos que actúen como capturadores de radicales, particularmente con el grupo SH, tioles tal como glutatión y proteínas. Esto puede conllevar a una subestimación del valor (Singh & Singh, 2008). Se ha argumentado que la reducción del hierro no tiene mucha relación con el atrapamiento de radicales, mecanismo seguido por la mayoría de los antioxidantes. Sin embargo, la oxidación o la reducción de los radicales a iones inhibe la cadena radicalaria, por lo que el poder reductor refleja la habilidad de los componentes en modular el potencial redox en los tejidos y en el plasma (Prior *et al.*, 2005).

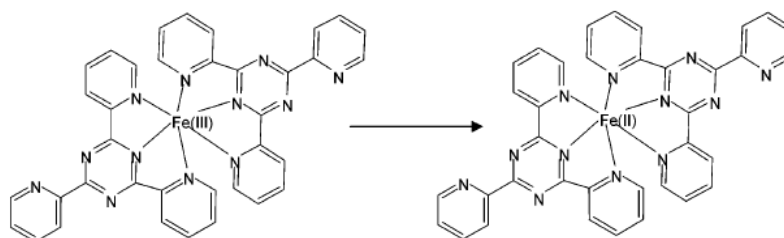


Fig 2.8. Reacción producida en el ensayo FRAP

Método DPPH (2,3 difenil-1- picrilhidracil)

El método está basado en medir la capacidad de captura de los antioxidantes mediante el radical libre DPPH (2,3 difenil-1-picrilhidracil). El electrón impar del átomo del DPPH es reducido mediante un átomo de H de los antioxidantes. El radical DPPH es uno de los pocos radicales estables con color púrpura, por lo que el método evalúa la disminución de la absorbancia a 515-528 nm producida por la adición de un antioxidante. El % que queda de DPPH es proporcional a la concentración del antioxidante y la concentración que causa un descenso en la concentración inicial de DPPH al 50% es llamado EC_{50} (Singh & Singh, 2008).

INTRODUCCIÓN

El ensayo es simple y rápido. Sin embargo, la interpretación puede ser complicada cuando existen componentes como los carotenoides que absorben a 515 nm y por lo tanto el espectro se superpone (Prior *et al.*, 2005).

Método ABTS (2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico)

El método se basa en la reducción del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por antioxidantes. Se testea los compuestos que disminuyen el color reaccionando directamente con el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Se produce la inhibición de la absorbancia del catión $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por antioxidantes que muestran un pico principal de absorción a 415 nm y otros de absorción secundaria a 660, 734, y 820 nm (Singh & Singh, 2008). El radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) es formado por oxidación de ABTS^{2-} con persulfato. Es considerado un método simple, y tiene la ventaja de que se puede usar en un amplio rango de pH. El radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ es soluble en disoluciones acuosas y disolventes orgánicos y no es afectado por la fuerza iónica, por lo que puede usarse para medir la capacidad de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos en distintas matrices (Prior *et al.*, 2005).

2.2.4.2 Ensayos asociados con la peroxidación lipídica

Los métodos asociados a la peroxidación lipídica consisten en la detección de productos de oxidación primaria y secundaria. Los productos asociados a la oxidación primaria son hidroperóxidos, mientras que los productos asociados a las reacciones de oxidación secundarias incluyen la degradación de hidroperóxidos como aldehídos y cetonas, epoxi-hidroperóxidos, oxo-hidroperóxidos, hidroperóxi epidioxidos, dihidroperóxidos, hidroperoxi bis-epidioxidos, e hidroperoxibicicloendoperoxidos (Frankel & Meyer, 2000).

Dada la naturaleza inestable de los productos de la peroxidación lipídica resulta difícil determinar la magnitud de esta peroxidación. Sin embargo, es más accesible determinar los productos de su degradación metabólica, constituidos fundamentalmente por aldehídos de alta capacidad reactiva, siendo el más significativo el malondialdehído (MDA). Hay referencias de diversos ensayos evaluando la peroxidación lipídica: ensayo ácido tiobarbitúrico, ensayo Malonadehído/Cromatografía líquida de alta eficiencia, ensayo malonadehído/cromatografía de gases, ensayo de blanqueo β -caroteno o ensayo de dienos conjugados (Moon & Shibamoto, 2009).

2.2.4.3 Método de Folin-Ciocalteu

El método Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) es el método utilizado con mayor frecuencia para la determinación del contenido de compuestos fenólicos en productos naturales o en los extractos obtenidos luego de un proceso de extracción. El reactivo Folin-Ciocalteu que es una mezcla de ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) y de ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) que reacciona con cualquier tipo de fenol. En la reacción los fenoles presentes en la muestra son oxidados y el reactivo de Folin-Ciocalteu se reduce, resultando a una mezcla compleja de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno que presenta un máximo de absorción a 765 nm. Aunque se trata de un método simple, preciso y sensible, existen diversas sustancias de naturaleza no fenólica

que interfieren en las determinaciones y que pueden dar lugar a concentraciones de compuestos fenólicos aparentemente elevadas, por lo que deben hacerse correcciones para estas sustancias. Entre ellas destacan las proteínas, el ácido ascórbico, el ácido úrico, algunos aminoácidos y nucleótidos, azúcares, aminas aromáticas y algunas sales inorgánicas (Prior *et al.*, 2005).

2.3 Extracción de compuestos bioactivos

La extracción de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales es el primer paso para su aplicación en la industria farmacéutica, de alimentos o cosmética. El método más empleado para la separación de los antioxidantes de los productos naturales es la extracción con disolventes y tanto el rendimiento de extracción como la actividad antioxidante de los extractos es fuertemente dependiente del disolvente. Para la extracción de compuestos fenólicos a partir de plantas se han utilizado diferentes disolventes: metanol, etanol, acetona, etil-acetato y combinaciones de estos con agua. El metanol es el más eficiente para los polifenoles de bajo peso molecular, mientras que los de alto peso molecular son extraídos con acetona. El etanol, el agua y la mezcla etanol-agua también son buenos disolventes y son los que actualmente son más utilizados por ser considerados disolventes GRAS (generalmente reconocidos como seguros). También se utilizan disolventes orgánicos acidificados para extraer antocianinas (Dai & Mumper., 2010). Otras variables que afectan al proceso de extracción son el tamaño de partícula, la temperatura y el pH (Moure *et al.*, 2001). La extracción Soxhlet, la maceración, etc., basadas en la elección de un disolvente, junto con el uso de la agitación y/o calor, son muy laboriosas y requieren cantidades relativamente grandes de disolvente, lo que ha motivado la necesidad de innovación para reducir el tiempo de extracción y el consumo de disolventes orgánicos además de contribuir a una mayor prevención de la contaminación (Wang & Weller, 2006).

En las plantas se encuentran desde compuestos fenólicos simples como los ácidos fenólicos y las antocianinas hasta sustancias altamente polimerizadas (ej. Taninos). Además los compuestos fenólicos pueden estar asociados con otros compuestos de las plantas como son los carbohidratos y las proteínas. Por lo tanto no existe un método universal de extracción para todos los compuestos fenólicos de origen vegetal. Los compuestos fenólicos que se extraigan de los materiales vegetales van a depender del disolvente utilizado en la extracción. Además el extracto puede contener otros compuestos no fenólicos (azúcares, ácidos orgánicos y grasas), que si no son deseados, deben eliminarse después de la extracción.

Entre los nuevos métodos se encuentran la extracción asistida por ultrasonidos, la extracción asistida por microondas, la extracción con fluidos supercríticos, la extracción acelerada con disolvente y los sistemas acuosos de dos fases que se ha encontrado que son métodos rápidos y eficientes para la extracción de productos químicos de matrices sólidas.

Los ultrasonidos facilitan el hinchamiento e hidratación de los materiales vegetales lo que resulta en un aumento del tamaño de poro de la pared celular. Esto mejora la difusión de los compuestos y, en consecuencia, exalta la transferencia de materia (Vinatoru, 1997). La extracción asistida por ultrasonidos es una alternativa sencilla,

INTRODUCCIÓN

eficiente y de bajo coste en comparación con las técnicas convencionales de extracción. Los principales beneficios de su uso para procesos de extracción sólido-líquido son el aumento del rendimiento de extracción y la mayor velocidad del proceso. Los ultrasonidos también pueden reducir la temperatura de operación necesaria lo que permite la extracción de compuestos termolábiles. En comparación con otras técnicas novedosas de extracción tales como la extracción asistida por microondas, el equipo de ultrasonidos es más barato y su funcionamiento es más fácil. Además, la extracción asistida por ultrasonidos, como la extracción Soxhlet, se puede utilizar con cualquier disolvente para la extracción de una amplia variedad de compuestos naturales (Wang & Weller, 2006).

La extracción con fluidos supercríticos tiene diversas ventajas: los fluidos supercríticos tienen baja viscosidad y alta difusividad, por lo tanto puede penetrar mejor en el poro de los materiales sólidos, esto conlleva a extracciones más rápidas. Además el poder de solvatación de un fluido supercrítico puede modificarse con cambios en la presión y en la temperatura, dando una buena selectividad. Uno de los disolventes más comunes en este tipo de extracción es el dióxido de carbono comprimido. Los solutos disueltos en dióxido de carbono pueden luego separarse fácilmente despresurizando. Se puede utilizar a bajas temperaturas, siendo muy útil cuando se trabaja con compuestos lábiles. Esta extracción se realiza en ausencia de luz y aire, por lo que la degradación y oxidación se reducen significativamente en comparación con otras técnicas de extracción. Esta técnica es más respetuosa con el medio ambiente debido a que reduce el uso de disolventes orgánicos, permitiendo la extracción realizada con disolventes no tóxicos como el CO₂ líquido. Sin embargo, debido a la aplicación de alta presión en estas técnicas, los requisitos de la instrumentación son altos y el coste de estos métodos a escala industrial es alto, que con frecuencia superan los beneficios técnicos (Lang & Wai, 2001).

La extracción acelerada con disolvente, es una nueva tecnología de extracción de biocompuestos, que usa disolventes orgánicos a altas temperaturas y presión. Al aplicar altas presiones se permite el uso de disolventes de extracción líquidos a mayores temperaturas que su punto de ebullición normal. El uso combinado de altas presiones (3,3-20,3 MPa) y temperaturas (50-200 °C) proporciona procesos de extracción más rápidos que requieren pequeñas cantidades de disolventes, dado que aumenta la solubilidad y cinética de los analitos (Richter *et al.*, 1996).

La extracción asistida por microondas es un proceso que utiliza energía de microondas para facilitar la partición de los compuestos de la matriz de la muestra en el disolvente. La principal ventaja de esta técnica es la reducción del tiempo de extracción, menor volumen del disolvente y mayores eficiencias en comparación con las técnicas convencionales de extracción (Belwal *et al.*, 2017).

Para sustituir o minimizar el uso de disolventes orgánicos se propone en este proyecto realizar la extracción con sistemas acuosos de dos fases (ATPS), que es una técnica que se ha utilizado para la recuperación primaria y purificación parcial de una gran variedad de productos biológicos, incluyendo proteínas, material genético, nanopartículas, productos de bajo peso molecular, células y orgánulos celulares (Becker *et al.*, 2009; Lisong *et al.*, 2010).

2.3.1 Sistemas acuosos de dos fases (ATPS). Características generales.

Comúnmente, para extraer biomoléculas de una fase líquida a otra, se utilizan dos técnicas de extracción: extracción líquido-líquido, con dos disolventes inmiscibles y los sistemas acuosos de dos fases. Los sistemas acuosos de dos fases se forman cuando dos compuestos solubles en agua, pero incompatibles entre sí, se disuelven en agua y superan una concentración crítica (Hatti-Kaul, 2000; Albertsson, 1986).

Esta técnica fue introducida por Albertsson, donde investigó el potencial de estos sistemas para la separación de células, partículas de las células y proteínas (Hatti-Kaul, 2000). A partir de entonces, los sistemas ATPS se convirtieron en una poderosa técnica de separación de muchos biomateriales, que incluyen células animales y vegetales, microorganismos, hongos y sus esporas, virus, mitocondrias, vesículas de las membranas, proteínas y ácidos nucleicos (Hatti-Kaul, 2000).

Actualmente el uso de la extracción líquido-líquido basada en sistemas acuosos de dos fases para la separación de biomoléculas ha ido creciendo debido a que es una técnica ambientalmente aceptable por su alto contenido en agua en ambas fases, la tensión superficial entre ellas es baja, lo que permite una alta transferencia de materia. El hecho de que ambas fases sean acuosas y tenga una tensión interfacial baja, proporciona un medio tal que permite que las biomoléculas y partículas celulares puedan repartirse entre las fases conservando su actividad. Por lo tanto, tiene baja degradación de biomoléculas, es fácil de operar, bajo coste de materiales y tiene la posibilidad de reciclar el polímero y la sal (Ratanapongleka, 2010). El escalado es fácil y el mismo puede realizarse a partir de datos de laboratorio en forma confiable, dado que el coeficiente de partición no varía con la escala (Tejeda *et al.*, 1995).

Esta técnica es hoy en día reconocida como una alternativa al fraccionamiento de biomoléculas, debido a las ventajas económicas y la simplicidad de la tecnología (Espitia-Saloma *et al.*, 2014; Rosa *et al.*, 2010). Es considerado un proceso integrado debido a que compuestos insolubles en una de las fases pueden ser eliminados, mientras que el producto deseado es purificado (Rosa *et al.*, 2010). Esto conlleva a menores costes energéticos, debido a que las etapas de operación son reducidas, obteniendo biomoléculas más concentradas y purificadas (Rosa *et al.*, 2010).

La recuperación y purificación eficiente de biomoléculas, es un punto clave en los procesos corriente abajo. La cromatografía se ha utilizado en forma eficiente debido a su simplicidad y alta resolución, pero al mismo tiempo es el cuello de botella debido a sus altos costes, baja productividad, problemas de escalado debido a los rellenos de las columnas, limitaciones en la difusión y que los tiempos de los ciclos son largos (Rosa *et al.*, 2010).

Por todo lo anterior existe un creciente interés en el desarrollo de procesos de extracción/purificación más eficientes y respetuosos con el medio ambiente ha promovido el uso de ATPS como método de separación (Ulloa *et al.*, 2012).

INTRODUCCIÓN

Los ATPS más comunes son los preparados con polietilenglicol (PEG)-dextrano o PEG-sal aunque, en la actualidad, los líquidos iónicos, los alcoholes o los agentes tensoactivos también han sido investigados (Ulloa *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013).

Como ejemplos de polímeros que se han usado en los ATPS están el polietilenglicol (PEG), dextrano, polipropilenglicol, polivinilpirrolidona e hidroxipropildextrano. El uso de PEG como polímero tiene muchas ventajas ambientales, ya que es biodegradable, no es tóxico y además no es inflamable (Chen *et al.* 2005, Khayati *et al.* 2011). El dextrano se caracteriza por no tener toxicidad y tiene un efecto estabilizador en células microbianas (Ratanapongleka, 2010). Sin embargo, el alto costo del dextrano y la dificultad de aislar compuestos de bajo peso molecular de cada fase, hace difícil la aplicación a gran escala de estos sistemas (Ratabapongleka, 2010; Simental-Martínez *et al.*, 2014). Una alternativa más económica para el dextrano son derivados de almidón, celulosa, metilcelulosa, etc. (Albertsson, 1986).

Los sistemas formados por PEG y una sal inorgánica son preferibles ya que tienen un menor costo, se logran separaciones rápidas y buenas recuperaciones. Hay una gran variedad de sales que se pueden utilizar para formar estos ATPS: sales de fosfato, sulfato de amonio, citrato de sodio, carbonato de sodio, etc. Sin embargo, la selección de la sal depende del compuesto de interés, ya que la sal y los distintos pH que confieren las mismas afectan de forma diferente a las interacciones de las sales con el agua.

Las sales de fosfato y sulfato son las que se utilizan con más frecuencia debido a su bajo costo. Además, los sistemas formados por PEG y una sal de fosfato son estables en un rango amplio de pH (entre 6 y 9) (Ratabapongleka, 2010). Por otro lado, los sistemas formados por PEG y una sal de sulfato se pueden utilizar cuando se necesitan valores de pH menores que 6. Estos sistemas están limitados debido a que cuando se necesita una cantidad elevada de sal, se requiere un esfuerzo mayor en el estudio de reuso de las sales, de modo de tener un proceso ambientalmente aceptable. Más recientemente, se prefiere los sistemas formados por PEG+sales de citrato, dado que el citrato es biodegradable y no es tóxico (Murugesan & Perumalsamy 2005). Por otro lado, si el compuesto de interés es recuperado en la fase rica en polímero, probablemente se requieran etapas con membranas para poder separarlo y reciclarlo (Simental-Martínez *et al.*, 2014).

Los ATPS formados por etanol y sal son de bajo costo y tienen la ventaja de que permiten la recuperación del alcohol por evaporación (Reis *et al.*, 2014; Espitia-Saloma *et al.*, 2014). Además tienen baja viscosidad, y usualmente conllevan altas eficiencias de extracción y purificación en un solo paso (Reis *et al.*, 2014). La baja viscosidad es relevante para la industria, ya que reduce los costes de bombeo (Simental-Martínez *et al.*, 2014; Ooi *et al.*, 2009). Estos sistemas tuvieron menos atención debido a que muchas biomoléculas (enzimas y proteínas) presentan baja solubilidad con la fase orgánica, y podía inactivar o desnaturalizar biomoléculas (Ooi *et al.*, 2009).

Para mejorar la eficiencia, la sustitución de los disolventes orgánicos por líquidos iónicos parece ser una alternativa prometedora. Los líquidos iónicos (ILs) son sales orgánicas (líquidas a temperatura ambiente) cuya temperatura de fusión se encuentra

por debajo de 100°C. Son compuestos formados por un catión orgánico y un anión de tamaño más pequeño. Dependiendo del catión y el anión seleccionado por lo que se les puede modificar la polaridad y afinidad de los compuestos, siendo por esta razón llamados disolventes de diseño (Simental-Martínez *et al.*, 2014). Son más caros que los disolventes orgánicos pero el interés por los mismos viene dado porque son la plataforma de nuevas tecnologías verdes. Específicamente debido a su alta estabilidad térmica y su poca volatilidad, se han vuelto atractivos para usarse como alternativas de disolventes orgánicos poco estables (Plechkova & Seddon, 2008).

Muchas investigaciones se han basado en IL basados en imidazolio, pero se han encontrado limitaciones en su uso debido a su precio, toxicidad y biodegradabilidad. Por ello existen tendencias a mejorar los IL existentes. Los basados en colina se han propuesto como una alternativa a los líquidos iónicos tradicionales debido a que el catión es poco tóxico, biodegradable, y se obtiene de un material económico (Deive *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2016).

Los sistemas ATPS formado por líquidos iónicos (IL)+surfactante, son un paso más para la construcción de sistemas bifásicos más competitivos. No solo por las características antes mencionadas de los IL, sino también debido a que los surfactantes contienen mayor cantidad de agua, menor costo, facilidad de eliminación de residuos, menor tensión interfacial y por lo tanto menor tiempo en la separación de fases (Salabat *et al.* 2010). Ejemplos de surfactantes no iónicos usados para formar ATPS son el Tween 80, Tween 20, que tienen una amplia aplicación en biotecnología, alimentación y sectores domésticos, debido que son considerados GRAS, y son clasificados como aditivos alimenticios en muchos países (Álvarez *et al.*, 2014).

Los ATPS se han utilizado para extraer y purificar diferentes productos biológicos (Benavides & Rito-Palomares, 2008; Aguilar & Rito-Palomares, 2010 y Ratanapongleka & Phetsom, 2011). Sin embargo, la utilización de este tipo de sistemas para la purificación de compuestos fenólicos de materiales renovables es muy limitada. Hassman *et al.*, 2008, utilizó un copolímero PEO-PPO-PEO, para la eliminación de compuestos fenólicos de hidrolizados de hemicelulosas. Además, sistemas compuestos por etanol/sulfato amónico han sido empleados para la extracción de piceid, resveratrol y emodina de *Polygonum cuspidatum*, (Wang *et al.*, 2008) y de antocianinas de *Morus atropurpurea* Roxb. (Wu *et al.*, 2011). También se ha estudiado la aplicabilidad de diferentes ATPS (polímero-polímero, líquido iónico-sal, polímero-sal) para la recuperación de compuestos bioactivos de bajo peso molecular y los ácidos fenólicos (*p*-cumárico y ferúlico) a partir de mazorca de maíz mediante sistemas acuosos compuestos con surfactantes (Dhamole *et al.*, 2013).

2.3.2 La curva binodal

La curva binodal sirve para determinar el área de trabajo donde se forman las dos fases por lo tanto se quiere disponer de ella para diseñar los procesos de extracción con los ATPS. Y describe al sistema bajo determinadas condiciones de trabajo: pH, temperatura, concentración del componente, etc. Del diagrama de fase se obtiene información que incluye la concentración de los componentes necesaria para formar dos fases en equilibrio, además de la composición de los componentes en ambas fases y la

INTRODUCCIÓN

relación de masas entre las mismas. Por encima de la curva binodal se forman dos fases inmiscibles (L+L) y por debajo de la misma, se encuentra la región de una sola fase (L) (Hatti-Kaul, 2000) (Ver Fig. 2.9).

La longitud de recta de reparto (LRR) conecta dos nodos (T, B) en la curva binodal, que representan la composición de la fase inferior y la superior en el equilibrio. Si por ejemplo seleccionamos diferentes sistemas cuya composición inicial sea distinta, pero que estas se sitúen sobre la misma línea de corte, las composiciones de las capas superiores e inferiores van a ser iguales (Hatti-Kaul, 2000). La LRR tiene las mismas unidades que la concentración de los componentes (%(w/w)), su longitud se relaciona con la relación de las masas de cada fase con la siguiente ecuación:

$$\frac{V_T \rho_T}{V_B \rho_B} = \frac{x_B}{x_T} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

donde V y ρ son el volumen y la densidad de la fase superior (T) e inferior (B) y x_B y x_T son los segmentos de la recta de reparto (Ver Fig. 2.9).

La LRR y la pendiente (S) de la misma se relacionan de la siguiente manera:

$$LRR = \left[(w_1^t - w_1^b)^2 - (w_2^t - w_2^b)^2 \right]^{0.5} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

$$S = \frac{(w_1^t - w_1^b)}{(w_2^t - w_2^b)} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

donde w_1^T , w_1^B , w_2^B y w_2^T representan la composición de equilibrio (en masa) de surfactante, polímero o alcohol (según corresponda) (1) y sal (2) en la fase superior, T y la inferior, B.

A medida que las longitudes de la recta de reparto (LRR) disminuyen, se aproximan al punto crítico (CP) donde la longitud de la recta de reparto es igual a cero, teóricamente es el punto donde el volumen y la composición de las dos fases es casi el mismo (Hatti-Kaul, 2000).

2.3.3 Mecanismo de partición

Los mecanismos que causan la distribución de las moléculas en las distintas fases no están del todo comprendidos. En general, la partición de las moléculas depende de las interacciones de las biomoléculas con los componentes de las fases, como interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacción electrostática, efectos estéricos, etc. El efecto neto de todos ellos, será diferente en las dos capas, y por lo tanto, la molécula migrará para donde la energía sea más favorable.

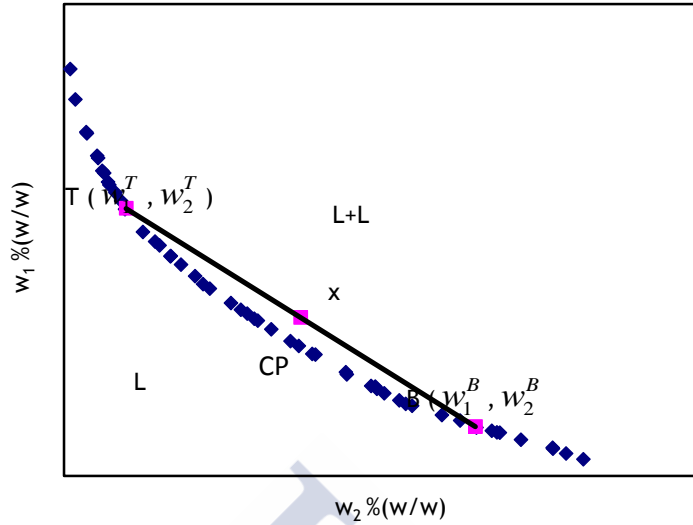


Fig 2.9. Curva binodal

La partición de las biomoléculas se describe con el coeficiente de reparto K , que es definida como la relación entre la concentración de la molécula de interés i en la fase superior C_{TPi} (mg/L) y la concentración de la molécula i en la fase inferior C_{BPi} (mg/L).

$$K = \frac{C_{TPi}}{C_{BPi}} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

Si la energía necesaria para ir de una fase a otra es ΔE , en el equilibrio, la constante de reparto puede ser escrita de la siguiente manera

$$K = \exp\left(\frac{\Delta E}{kT}\right) \quad \text{Ecuación 2.5}$$

donde, k es la constante de Boltzman y T es la temperatura absoluta. La energía, ΔE depende del tamaño de la partícula, cuanto más grande es, mayor cantidad de átomos pueden interactuar con los alrededores (Hatti Kaul, 2000, Ratanapongleka, 2010).

Experimentalmente se encontró que la constante de reparto se puede escribir como la suma de varios términos logarítmicos:

$$\ln K = \ln K_0 + \ln K_{\text{elec}} + \ln K_{\text{hydrop}} + \ln K_{\text{biosp}} + \ln K_{\text{size}} + \ln K_{\text{conf}} + \dots \quad \text{Ecuación 2.6}$$

donde el K_{elec} incluye los efectos electrostáticos como son carga de la molécula, distribución del ión y también carga del polímero, K_{hydrop} el término hidrofóbico, K_{biosp} incluye la afinidad de las interacciones entre los ligandos que son agregados al sistema, K_{size} , un término del tamaño de la molécula y el polímero, K_{conf} , un término que representa los efectos conformacionales, y K_0 representa otros factores (Hatti Kaul, 2000, Ratanapongleka, 2010).

INTRODUCCIÓN

Otros parámetros como la relación de volúmenes V_r son evaluados para entender la distribución de las moléculas entre las fases,

$$V_r = \frac{V_{TP}}{V_{BP}} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

donde, V_{TP} y V_{BP} son los volúmenes de la fase superior y la inferior, respectivamente.

2.3.4 Influencia de los parámetros de operación sobre la extracción y partición de compuestos fenólicos

La partición de las biomoléculas en los sistemas ATPS, es determinada por la afinidad de las moléculas por una determinada fase. La afinidad de las biomoléculas por una determinada fase es la base para la separación mediante ATPS. El fraccionamiento, la recuperación y la purificación de las moléculas se tiene que caracterizar y optimizar estudiando diferentes parámetros del sistema, como el tipo de ATPS (polímero-polímero, polímero-sal, alcohol-sal, etc.), la longitud de línea de corte (LRR), la relación de volúmenes (V_r), el tipo de sal, pH, el peso molecular del polímero, etc. (Simental-Martínez *et al.*, 2014).

La complejidad de las interacciones químicas y físicas involucradas en la partición de moléculas, hace que estos sistemas sean poderosos si los comparamos con otras técnicas de separación, dado que se pueden manipular muchas de las variables del sistema que están involucradas (Rosa *et al.*, 2010).

Por otro lado, debido a la complejidad de estos sistemas y a que no está del todo comprendido el mecanismo de partición, el escalado y el diseño del proceso ATPS han de hacerse de forma experimental. El tiempo que supone la parte experimental, la baja previsibilidad de los cambios del proceso, es el mayor cuello de botella de estos procesos para ser implementados a escala industrial (Rosa *et al.* 2010)

2.3.4.1 Longitud de la recta de reparto (LRR)

Al aumentar la longitud de la recta de reparto (LRR), se espera un aumento en la hidrofobicidad de la fase superior, y por lo tanto, afecta la partición de los compuestos fenólicos. Como se mencionó anteriormente, la LRR es un parámetro que relaciona la concentración en equilibrio de la fase superior con la fase inferior. Al trabajar a valores bajos de la LRR, las fases en equilibrio se encuentran cerca del punto crítico. A medida que la LRR aumenta, las características de cada fase difieren en mayor medida como consecuencia del aumento de la concentración en cada fase. Si, por ejemplo, se trabaja en sistemas basados en polímeros+sales, al aumentar la LRR, aumenta la concentración del polímero en la fase superior. Además aumenta el volumen excluido y por lo tanto, la hidrofobicidad del sistema (Benavides & Rito-Palomares, 2008; Gómez-Loredo *et al.*, 2014). La partición de las biomoléculas va a cambiar, la constante de reparto va a aumentar o disminuir (Albertsson, 1986).

2.3.4.2 Tipo de sal

En los ATPS formados por polímeros y sales, el tipo de sal tiene una importante influencia en la extracción y partición de las biomoléculas. Diferentes sales confieren diferentes pH y, por lo tanto, presentan diferencias en cuanto a la capacidad de penetrar en las células vegetales y extraer el compuesto. Los ATPS presentan una de las fases con características hidrofóbicas y otra fase más hidrofílica. La afinidad de los compuestos a extraer por determinada capa depende de la carga neta de la superficie de la biomolécula. Muchos compuestos fenólicos pueden comportarse como una base o un ácido (anfoterismo), liberando o retirando protones. Cuando el pH está por debajo del pKa de una molécula determinada, la forma molecular es la predominante. Esta forma es más hidrofóbica que la disociada. En general, cuando se trabaja con sistemas basados en PEG+sal, trabajando a valores de pH por debajo del pKa, los polifenoles tendrán mayor afinidad por el PEG debido a que se incrementan las interacciones hidrofóbicas (Shen *et al.*, 2006).

Por otro lado la denominada serie Hofmeister clasifica los iones en función de su capacidad de cambiar la estructura del agua. Los efectos de estos cambios primero fueron estudiados y categorizados a finales del siglo XIX por Franz Hofmeister, en base a la fuerza de las sales en base a su capacidad para estructurar o desestructurar el agua. El mecanismo de la serie de Hofmeister no está enteramente claro, aunque los últimos estudios convergen hacia la idea de que los efectos de “salting out” o “salting in” están relacionados con la fuerza de las interacciones específicas entre los iones y las moléculas de agua. Así, mientras los iones “salting out” disminuyen la solubilidad de moléculas no polares, consolidando las interacciones hidrofóbicas, los iones “salting in” conllevarán un aumento de la solubilidad de moléculas no polares y del orden del agua, debilitando el efecto hidrofóbico (Zhang & Cremer, 2006).

2.3.4.3 Relación de volúmenes entre fases (V_r)

La partición de las moléculas depende de la relación de volúmenes. Al aumentar la relación de volúmenes, aumenta el volumen disponible en la fase superior. Esto conlleva a disminuir los potenciales efectos de saturación que pudiesen existir. Sin embargo, al aumentar la relación de volúmenes, puede disminuir la selectividad de los sistemas, dado que puede promover la partición de moléculas no deseables a la fase superior (Benavides & Rito-Palomares, 2008; Gómez-Loredo *et al.*, 2014).

2.3.4.4 Peso molecular (MW) y concentración del polímero

Si para una fase con determinada composición, el polímero es cambiado por otro de diferente peso molecular, la partición de las moléculas se verá afectada (Albertsson, 1986). El peso molecular del polímero cambia tanto el diagrama de equilibrio como la cantidad de interacciones entre el polímero y la biomolécula. Además, cuanto mayor sea el peso molecular del polímero, mayor será el volumen excluido, por lo que se logra que una mayor cantidad de agua sea excluida de la fase superior. Cuanto más hidrofóbico es el compuesto que se intenta recuperar, el peso molecular del polímero debe ser mayor. Se debe tener en cuenta, que cuanto más alto es el peso molecular del polímero, mayor

INTRODUCCIÓN

es la viscosidad de la fase, encareciendo el proceso debido al mayor coste de bombeo y mayor coste de remoción del mismo (Ratanapongleka, 2010).

2.3.4.5 Temperatura

La temperatura juega un rol muy importante en la extracción de compuestos fenólicos de materiales vegetales. Por una parte, en una variedad de sistemas ATPS formados por polímero+sal o surfactante+líquido iónico se observó que la temperatura tiene una fuerte incidencia en la curva binodal (Voros *et al.*, 1993; Willauer *et al.*, 2000; Álvarez *et al.*, 2015). Cuanto mayor es la temperatura, mayor es la longitud de la línea de corte y la pendiente de la misma, consecuentemente la composición de las fases en equilibrio cambia significativamente. La incidencia de esta variable es muy importante ya que este cambio conlleva a cambiar las condiciones de equilibrio y, por lo tanto, afecta al rendimiento de extracción alcanzado. También se ha publicado en literatura que la temperatura tiene efectos despreciable sobre las condiciones de equilibrio de algunos sistemas ATPS basados en alcoholes y sales (Wang *et al.*, 2010).

Por otra parte, al incrementarse la temperatura, aumenta la solubilidad del soluto, y también aumenta la difusividad efectiva en el interior de las partículas, por lo que se han observado mejores rendimientos de extracción y tiempos de extracción más cortos al incrementar la temperatura (Jokic *et al.*, 2010).

Además, el poder de solvatación del disolvente también se incrementa con la temperatura, permitiendo que una mayor diversidad de compuestos activos se disuelva en el mismo. Esto puede resultar desfavorable, si lleva a una disminución de la selectividad de la extracción. También hay que tener en cuenta que altas temperaturas pueden afectar la estabilidad de los compuestos fenólicos debido a reacciones de degradación química y enzimática o producir pérdidas por volatilización o descomposición térmica, disminuyendo así la actividad antioxidante de los extractos obtenidos. Por lo tanto, los criterios de selección de la temperatura de extracción adecuada deben tener en cuenta tanto la eficiencia de la extracción, la selectividad y la estabilidad térmica de los compuestos activos (Jokic *et al.*, 2010).

2.3.4.6 Tiempo de extracción

La cinética de extracción de compuestos fenólicos de diferentes materiales vegetales se ha descrito en la literatura empleando diferentes modelos. Las curvas de extracción habitualmente muestran una etapa inicial muy rápida (etapa de lavado), seguida luego de unos pocos minutos de una etapa muy lenta (etapa de difusión) donde el rendimiento de extracción aumenta lentamente al transcurrir el tiempo (Bucic-Kojic *et al.*, 2007, Jokic *et al.*, 2010).

2.3.4.7 Relación sólido/líquido (S/L)

Al disminuir la relación sólido-líquido, se espera un incremento en el rendimiento de extracción (Pin *et al.*, 2006). Al mantenerse la fase líquida más diluida por un incremento en la cantidad de disolvente empleado, el potencial para la transferencia de materia se hace mayor y la densidad del flujo de materia aumenta. Esto se debe a que la

fuerza impulsora para la transferencia de materia es el gradiente de concentración entre el sólido y el seno de la solución (Radojković *et al.*, 2012). Sin embargo una disminución de la relación (S/L) más allá de los valores óptimos, encarecerá el proceso debido al empleo de una mayor cantidad de disolvente y a la obtención de extractos más diluidos, sin obtener mejoras significativas ni en el rendimiento ni en el tiempo de extracción.

2.4 Aplicaciones de los compuestos fenólicos

Como se ha mencionado anteriormente, los compuestos fenólicos tienen aplicación en el sector alimentario, cosmético y farmacéutico, debido a su capacidad de disminuir la formación de radicales libres de las células y tejidos en el organismo humano.

En la industria de alimentos se utilizan para incrementar la vida útil de los mismos, asociado a la prevención de la peroxidación lipídica. Las antocianinas procedentes de las cerezas, se utilizan en la carne porque inhiben la formación de aminas aromáticas heterocíclicas y la oxidación del colesterol durante el proceso de fritura, además de inhibir la peroxidación lipídica en un 93,5-100% frente a los obtenidos con antioxidantes sintéticos como el BHA (87,1%), BHT (94,3%) (Muraleedharan & Nair, 2002; Ochoa & Ayala, 2004). El ácido elágico es utilizado para la conservación de alimentos como agente inhibidor de microorganismos en las cubiertas comestibles llamadas films, diseñadas para extender la vida útil de los alimentos, y protegen a los alimentos de los microorganismos. Las cubiertas sirven como portadoras de compuestos antimicrobianos y/o antioxidantes para lograr altas concentraciones de conservantes en las superficies de los alimentos (Saucedo-Pompa *et al.*, 2009). En la industria de bebidas, por ejemplo, los elagitaninos y el ácido elágico se emplean para la clarificación de las bebidas, sobre todo en la industria cervecera (Doussot *et al.*, 2000). Las catequinas se utilizan como aditivos endulzantes y saborizantes en las gomas de mascar, dulces y mieles (Kashket, 1990; Ochoa & Ayala, 2004).

El ácido ferúlico es utilizado como precursor de la vanilina natural y se utiliza en la industria cosmética para la fabricación de protectores solares y cremas, debido a sus propiedades antioxidantes y su alta absorción a la radiación UV. Se cree que el ácido *p*-coumárico que reduce el riesgo del cáncer del estómago (Max *et al.*, 2010; Akpinar *et al.*, 2015). Los flavonoides se utilizan también en productos farmacéuticos como pasta dental, enjuagues bucales y drogas (Kashket, 1990). Los ésteres de flavonoides tienen aplicaciones en los humectantes y cosméticos porque actúan como descongestionantes, agentes de tratamiento de piel sensible, agentes de fortalecimiento de capilares sanguíneos y agentes anti envejecimiento (Perrier *et al.*, 2001; Ochoa & Ayala, 2004). En el sector industrial, el ácido gálico es usado como agente antibacterial en la industria del cuero, también se utiliza para la producción de antibióticos (trimetoprim) y como antioxidante (Ventura *et al.*, 2008).





3. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 Materiales. Preparación de la materia prima

3.1.1 Restos de cizallado de chapas de eucalipto

Los restos de cizallado de chapas de *Eucalyptus globulus* fueron suministrados por una empresa (ASERPAL S.A. Grupo LOSÁN) especializada en la fabricación de superficies de madera fina ubicada en España, Galicia. Las chapas se utilizan para el recubrimiento de los tableros, y cuando se fabrican los mismos, se producen una gran cantidad de residuos (restos de cizallado de chapas) en la etapa de acabado. La madera de eucalipto es pretratada con agua a 75°C durante 16 horas. Posteriormente, las chapas para los tableros se obtienen cortando la madera longitudinalmente, produciéndose una cantidad de restos, que son los que constituyen la materia prima de este trabajo.

Posteriormente, el material se secó a temperatura ambiente hasta obtener un contenido de humedad próxima al equilibrio (~10,3%). Finalmente, los restos de cizallado se cortaron en piezas de 0,60 mm x 10 mm x 20 mm y se almacenaron en bolsas de polietileno hasta su uso. Se midió el contenido de humedad mediante una balanza de humedades (Sartorius Moisture Analyzer MA30), que se basa en el método termogravimétrico, que permite someter a las muestras a un proceso de secado a 105 °C con energía infrarroja durante 99 minutos y que tras la determinación de la pérdida de peso que experimenta la muestra original, da directamente el contenido de humedad.

3.1.2 Aserrín de eucalipto

El aserrín de *Eucalyptus grandis* fue suministrado por un aserradero ubicado en Rivera, Uruguay (URUFOR S.A.). En los aserraderos uruguayos aproximadamente el 50% de la madera que ingresa como troza queda como residuo, fundamentalmente bajo la forma de costaneros y aserrín.

El material se secó a temperatura ambiente hasta alcanzar la humedad próxima al equilibrio (~8,0 %). Luego se molió en un molino de martillos y se seleccionaron partículas entre 0,5 y 1 mm. Finalmente se homogeneizó y almacenó en bolsas de polietileno para mantener su humedad constante. Se midió el contenido de humedad según la metodología descrita previamente (Ver 3.1.1).

3.1.3 Paja de trigo

La paja de trigo (WS, por sus siglas en inglés), residuo principal de la cosecha del cereal, fue suministrada por un productor de trigo de Obregón, México. Nuevamente, el material se secó a temperatura ambiente hasta alcanzar la humedad próxima al equilibrio (~5,3 %). Luego se molió en un molino de martillos, tamizó y se obtuvieron partículas de tamaño entre 0,5 y 1 mm. Finalmente se homogeneizó y almacenó en bolsas de polietileno para mantener su humedad constante. Se midió el contenido de humedad mediante la eliminación del agua por evaporación en una estufa a 105 °C hasta peso constante. La determinación de la humedad se calculó por diferencia de peso.

MATERIALES Y MÉTODOS

La paja de trigo fue sometida a una hidrólisis ácida con H_2SO_4 4% (w/w) en autoclave a 103 kPa (121°C) durante 30 min, utilizando una relación sólido/líquido de 1/10 g/g (Iranmahboob *et al.*, 2002). Una vez finalizada la reacción, el material sólido (WS_1) fue separado por filtración a vacío, lavado y secado al aire durante 24 horas. Posteriormente se determinó el peso del sólido y el rendimiento de la hidrólisis ácida (1,56 g WS/WS_1).

Al material sólido obtenido (WS_1) se lo sometió a una hidrólisis alcalina con NaOH 2 M en un autoclave a 103 kPa (121°C), durante 30 min, utilizando una relación sólido/líquido 1:10 g/g (Akpınar & Usal, 2015). Nuevamente, fue separado por filtración a vacío el material sólido (WS_2). Al hidrolizado básico (HB) se le determinó el volumen y el rendimiento de la hidrólisis (0.18 g WS_1/mL HB). Finalmente el hidrolizado básico fue neutralizado (HBN) con HCl 2 N previo a la extracción mediante los sistemas bifásicos.

3.2. Extracción con Sistemas acuosos de dos fases (ATPS)

3.2.1 Estudio de ATPS basados en polietilenglicol (PEG) 2000 y sales para restos de cizallado de chapas de eucalipto

Para la preparación de los ATPS se utilizaron datos de equilibrio encontrados en la bibliografía de los siguientes sistemas:

- 1) Agua + PEG 2000 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Voros *et al.*, 1993)
- 2) Agua + PEG 2000 + K_2HPO_4 (Peng *et al.*, 1994).
- 3) Agua + PEG 2000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (Murugesan & Perumalsamy, 2005)

No se encontraron los datos de equilibrio para el sistema Agua + PEG 2000 + $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, por lo que el sistema se inició agregando una cantidad conocida de PEG 2000. A dicha disolución se le agregó gota a gota una disolución de sal de fracción másica conocida, con agitación constante hasta que la mezcla se tornó turbia y posteriormente se adicionó más disolución salina hasta formar el ATPS.

Para realizar las extracciones se prepararon los ATPS de acuerdo a las composiciones de alimentación seleccionadas (Tabla 3.1). Cada sistema se preparó agregando una cantidad conocida de sal en agua en un matraz Erlenmeyer de 100 mL. A la disolución formada se le midió el pH (pH_1) y se le añadió la correspondiente cantidad conocida de PEG. Finalmente, las piezas de eucalipto se añadieron al ATPS de acuerdo con la relación sólido/líquido seleccionada. El matraz se introdujo en un baño de agua con agitación orbital (UNITRONIC-OR, Selecta) durante el tiempo seleccionado en cada experimento. La cantidad de líquido utilizado fue de 50 g.

Transcurrido el tiempo de sedimentación, el sólido fue separado y las fases fueron separadas en un embudo de decantación. Se tomaron muestras de cada una de las fases y se les midió el pH, el volumen, la masa, y se les determinó el contenido total de fenoles

mediante el método explicado en el apartado 3.3.1

Las variables analizadas fueron el tiempo de sedimentación (1, 4, 8 y 15 h), la temperatura (25, 45 y 65°C), la sal inorgánica, la composición de alimentación del ATPS, el tiempo de extracción (30, 90, 270 y 390) y la relación sólido/líquido ((S/L)=g de biomasa seca/g de disolvente) (0,2:10, 0,5:10, 0,7:10, 1:10, 1,2:10 y 1,5:10) en la recuperación y partición de compuestos fenólicos. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Tabla 3.1

Composición de alimentación seleccionada para los ATPS basados en PEG 2000 y sales. Datos a 25°C.

| PEG 2000-(NH ₄) ₂ SO ₄ | | | | | | |
|---|-------------------|--|----------------------------|---------------|----------------|-----------------|
| Sistema | PEG2000 %(g/g) | (NH ₄) ₂ SO ₄ %(g/g) | H ₂ O %(g/g) | LRR %(g/g) | V _r | pH ₁ |
| 1 | 12,9 | 12,3 | 74,8 | 31,4 | 0,7 | 5,2 |
| 2 | 16,5 | 12,9 | 70,6 | 39,7 | 0,7 | 5,3 |
| 3 | 16,4 | 15,2 | 68,4 | 45,4 | 0,7 | 5,0 |
| PEG2000- KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ | | | | | | |
| | PEG2000 %(g/g) | KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ %(g/g) | H ₂ O %(g/g) | LRR %(g/g) | V _r | pH ₁ |
| 4 | 8,0 | 18,4 | 73,6 | ND | 0,3 | 7,7 |
| 5 | 16,1 | 19,6 | 64,3 | ND | 0,6 | 7,7 |
| 6 | 20,0 | 25,0 | 55,0 | ND | 0,9 | 7,7 |
| PEG 2000- K ₂ HPO ₄ | | | | | | |
| | PEG2000 %(g/g) | K ₂ HPO ₄ %(g/g) | H ₂ O %(g/g) | LRR %(g/g) | V _r | pH ₁ |
| 7 | 11,6 | 9,7 | 78,7 | ND | 1,0 | 10,1 |
| 8 | 15,9 | 11,3 | 72,8 | ND | 1,0 | 10,1 |
| 9 | 22,0 | 10,5 | 67,5 | ND | 1,2 | 10,1 |
| PEG 2000- Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ | | | | | | |
| | PEG2000 %(g/g) | Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ %(g/g) | H ₂ O %(g/g) | LRR %(g/g) | V _r | pH ₁ |
| 10 | 15,5 | 13,6 | 70,9 | 26,1 | 1,1 | 9,1 |
| 11 | 18,5 | 15,1 | 66,4 | 40,4 | 1,0 | 9,1 |
| 12 | 20,0 | 16,0 | 64,0 | 46,1 | 0,9 | 9,1 |

LRR: Longitud de la recta de reparto; V_r: relación de volúmenes entre fases

3.2.2 Estudio de ATPS basados en Etanol y Sales para restos de cizallado de chapas de eucalipto

Para la preparación de los ATPS basados en etanol se utilizaron datos de equilibrio encontrados en la bibliografía de los siguientes sistemas:

- 1) Agua + etanol + (NH₄)₂SO₄ (Wang *et al.*, 2010)
- 2) Agua + etanol + K₂HPO₄-KH₂PO₄ (Reis *et al.*, 2012)
- 3) Agua + etanol + K₂HPO₄ (Reis *et al.*, 2012).

Para realizar las extracciones se prepararon los ATPS de acuerdo a las composiciones de alimentación seleccionadas (Tabla 3.2). Toda la metodología de

MATERIALES Y MÉTODOS

extracción fue la descrita en el apartado 3.2.1. Las variables analizadas fueron el tiempo de sedimentación (1, 6 y 15 h), la temperatura (25, 45 y 65°C), la longitud de la recta de reparto (LRR), V_r y el tipo de sal utilizada en la recuperación y partición de compuestos fenólicos. Además se determinó la capacidad antioxidantes FRAP de los extractos (Ver apartado 3.3.3.1). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Tabla 3.2

Composición de alimentación seleccionada para los ATPS basados en Etanol y sales. Datos a 25°C.

| Etanol- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | | | | | | |
|---|------------------|---|--------------------------------|---------------|-------|-----------------|
| Sistema | Etanol %(g/g) | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ %(g/g) | H_2O %(g/g) | LRR %(g/g) | V_r | pH ₁ |
| 1 | 25,0 | 19,5 | 55,5 | 45 | 1,0 | 5,2 |
| 2 | 26,0 | 20,0 | 54,0 | 52 | 1,0 | 5,3 |
| 3 | 27,0 | 20,5 | 52,5 | 57 | 1,0 | 5,2 |
| 4 | 15,0 | 28,0 | 57,0 | 57 | 0,1 | 5,2 |
| 5 | 40,6 | 12,0 | 47,4 | 57 | 2,8 | 5,2 |
| Etanol- $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ | | | | | | |
| | Etanol %(g/g) | $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ %(g/g) | H_2O %(g/g) | LRR %(g/g) | V_r | pH ₁ |
| 6 | 22,0 | 28,0 | 50,0 | 21 | 1,1 | 7,4 |
| 7 | 24,0 | 30,0 | 46,0 | 28 | 1,0 | 7,3 |
| 8 | 27,0 | 31,0 | 42,0 | 32 | 1,3 | 7,4 |
| 9 | 27,0 | 20,0 | 53,0 | 27 | 2,3 | 7,4 |
| Etanol- K_2HPO_4 | | | | | | |
| | Etanol %(g/g) | K_2HPO_4 %(g/g) | H_2O %(g/g) | LRR %(g/g) | V_r | pH ₁ |
| 10 | 18,0 | 21,5 | 60,5 | 38 | 1,1 | 9,6 |
| 11 | 20,0 | 22,5 | 57,5 | 46 | 1,0 | 9,7 |
| 12 | 24,0 | 23,5 | 52,5 | 57 | 1,1 | 9,8 |
| 13 | 35,0 | 9,3 | 55,7 | 46 | 6,4 | 9,7 |
| 14 | 10,0 | 31,3 | 58,7 | 46 | 0,3 | 9,7 |

LRR: Longitud de la recta de reparto; V_r : relación de volúmenes entre fases

3.2.3 Estudio de ATPS basados en PEG de peso molecular variable y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para aserrín de eucalipto

Para la preparación de los ATPS se utilizaron datos de equilibrio encontrados en la bibliografía de los siguientes sistemas:

- 1) Agua + PEG 1000 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Voros *et al.*, 1993)
- 4) Agua + PEG 2000 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Voros *et al.*, 1993)
- 2) Agua + PEG 4000 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Khayati *et al.*, 2011).

Para realizar las extracciones los ATPS se prepararon de acuerdo a las composiciones de alimentación seleccionadas (Tabla 3.3). Toda la metodología de extracción fue la descrita en el apartado 3.2.1. Las variables analizadas fueron: LRR, y el peso molecular del PEG (MW) en la recuperación y partición de compuestos fenólicos. También se determinó la capacidad antioxidantes FRAP de los extractos (Apartado 3.3.3.1). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Tabla 3.3

Composición de alimentación seleccionada para los sistemas ATPS basados en PEG y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Datos a 25°C

| Sistema | PEG+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | | | | | | pH ₁ |
|---------|-----------------------------------|-------------|--------------------------------------|--------------------------|-------------|----------------|-----------------|
| | PEG MW (g/mol) | PEG % (g/g) | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ % (g/g) | H ₂ O % (g/g) | LRR % (g/g) | V _r | |
| 1 | 1000 | 16,9 | 13,5 | 69,6 | 31,9 | 1,0 | 5,1 |
| 2 | | 18,5 | 14,0 | 67,5 | 38,3 | 1,0 | 5,2 |
| 3 | | 21,2 | 14,5 | 64,3 | 45,2 | 1,0 | 5,3 |
| 4 | 2000 | 15,3 | 11,0 | 73,7 | 31,4 | 1,0 | 5,2 |
| 5 | | 18,1 | 12,0 | 69,9 | 39,7 | 1,0 | 5,2 |
| 6 | | 21,3 | 12,5 | 66,2 | 45,4 | 1,1 | 5,3 |
| 7 | 4000 | 23,4 | 12,0 | 64,6 | 33,3 | 0,9 | 5,2 |
| 8 | | 23,5 | 13,5 | 63,0 | 38,8 | 0,9 | 5,0 |

LRR: Longitud de la recta de reparto; V_r: Relación de volúmenes entre fases; MW: Peso molecular del polímero

3.2.4 Estudio de ATPS basados en Etanol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para aserrín de eucalipto

Para la preparación de los ATPS basados en etanol se utilizaron los datos de equilibrio encontrados en la bibliografía del siguiente sistema:

- 1) Agua + etanol + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Wang *et al.*, 2010)

Para realizar las extracciones se formaron los ATPS de acuerdo a las composiciones de alimentación seleccionadas (Tabla 3.4). Toda la metodología de extracción fue la descrita en el apartado 3.2.1.

Las variables analizadas fueron, LRR, V_r, la relación (S/L) (0,25:10, 0,5:10 y 1:10), y la temperatura (25, 45 y 65°C). Además se evaluó la capacidad antioxidantes FRAP de los extractos (Ver apartado 3.3.3.1). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Tabla 3.4

Composición de alimentación seleccionada para los sistemas ATPS basados en Etanol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Datos a 25°C.

| | Etanol- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | | | | | | pH ₁ |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|-------------|----------------|--|-----------------|
| | Etanol % (g/g) | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ % (g/g) | H ₂ O % (g/g) | LRR % (g/g) | V _r | | |
| 1 | 26,0 | 20,0 | 54,0 | 51,9 | 1,0 | | 5,1 |
| 2 | 25,0 | 19,5 | 55,5 | 44,9 | 1,0 | | 5,2 |
| 3 | 27,0 | 20,5 | 52,5 | 56,7 | 1,0 | | 5,2 |
| 4 | 40,6 | 12,0 | 47,4 | 56,7 | 2,8 | | 5,2 |

LRR: Longitud de la recta de reparto; V_r: relación de volúmenes entre fases

3.2.5 Estudio de ATPS basados en Tween 20 y dihidrógeno citrato de colina (ChDHC) para paja de trigo

3.2.5.1 Determinación de los datos de equilibrio

Para la construcción de los sistemas bifásicos acuosos se utilizó Polioxietileno (20) monolaurato de sorbitán (Tween 20) y se combinó con dihidrógeno citrato de colina (ChDHC, cuya estructura química se muestra en la Fig. 3.1) disuelta en agua.

Las curvas binodales se determinaron mediante el método del punto de niebla. El sistema se inició añadiendo agua a una mezcla binaria de Tween 20 y ChDHC a un tubo de vidrio con tapón hasta que los sólidos desaparecieron. De esta forma se delimitó la región sólido+ 2L (líquido). La composición exacta de la mezcla ternaria fue determinada por una balanza analítica (Sartorius Cubis MSA). Posteriormente se le fue añadiendo al tubo de vidrio gotas de agua bajo agitación constante hasta que la mezcla se tornó límpida, indicando que se alcanzó la región monofásica. La composición de esa mezcla fue anotada. El área entre estos dos puntos es la región bifásica del sistema (Albertson, 1986). Las curvas binodales fueron determinadas experimentalmente diferentes temperaturas (20, 40, 50 y 60°C) en una celda de vidrio controlado por un termostato y equipada con un agitador magnético. Las medidas de temperatura se realizaron con un termómetro digital (F200 ASL).

Las LRR fueron determinadas como se describe a continuación: se seleccionó una mezcla ternaria en la región bifásica. Se agitó durante una hora y posteriormente se dejó sedimentar por 48 horas. Luego las fases fueron separadas con una jeringa, y se les determinó la densidad y el índice de refracción mediante un densímetro de tubo vibrante (Anton Paar DSA-48) y un refractómetro (Dr. Kernchen ABBEMAT WR). Previamente se realizó una curva de calibración para definir la composición de las LRR (Álvarez *et al.*, 2015).

3.2.5.2 Procedimiento de extracción y separación

Para realizar las extracciones se utilizaron 3 g del hidrolizado básico neutralizado (HBN), y las composiciones de los componentes para formar los ATPS fueron seleccionadas de acuerdo a los datos obtenidos en las curvas binodales y las LRR.

Una cantidad conocida del líquido iónico fue disuelta en el HBN y a la disolución se le midió el pH (pH_1) (Tabla 3.5). Posteriormente, para formar el ATPS, se le añadió la cantidad correspondiente de Tween 20 de acuerdo a la composición seleccionada (Ver tabla 3.5). La cantidad de líquido usado en la extracción fue de 15 g, por lo que en caso que correspondiera, se completó el faltante con agua. Las mezclas se agitaron durante media hora y se dejaron en reposo durante 12 h para alcanzar la completa separación de las fases. La agitación y el control de temperatura fue el mismo que se describió en el apartado 3.2.5.1. Se tomaron simultáneamente muestras de la fase superior e inferior mediante una jeringa. Las variables analizadas fueron la temperatura y la composición en la alimentación sobre el contenido total de fenoles y los ácidos fenólicos.

El contenido total de fenoles fue determinado en ambas fases a diferentes temperaturas (20, 40, 50 y 60°C). Finalmente se determinó en ambas fases, el volumen, la actividad antioxidante DPPH, la actividad antioxidante ABTS, la cantidad de ácido ferúlico (FA) y *p*-cumárico (CA). Todos los experimentos fueron realizados en triplicado.

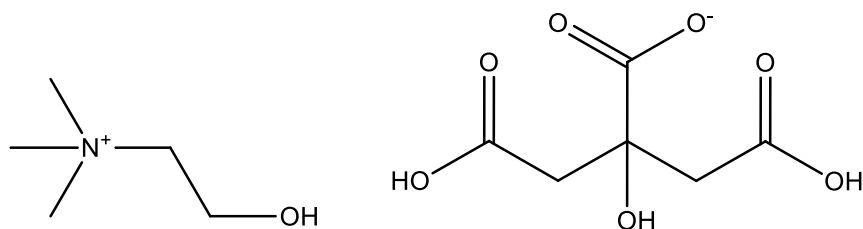


Fig. 3.1. Estructura de ChDHC

Tabla 3.5

Composición de alimentación seleccionada para los sistemas ATPS basados en Tween 20 y ChDHC. Datos a 20 °C

| Sistema | Tween20 %(g/g) | ChDHC %(g/g) | LRR %(g/g) | V _r | pH _i |
|---------|-------------------|-----------------|---------------|----------------|-----------------|
| 1 | 28,2 | 50,0 | 106,1 | 0,42±0,02 | 4,30±0,0 |
| 2 | 61,1 | 25,0 | 106,1 | 4,72±0,19 | 4,21±0,0 |
| 3 | 51,9 | 32,0 | 106,1 | 1,42±0,16 | 4,25±0,0 |

LRR: Longitud recta de reparto; V_r: Relación de volúmenes entre fases

3.2.6 Determinación del coeficiente de reparto (K) y la eficiencia de extracción (%EE)

El coeficiente de reparto se determinó como la relación entre la concentración de compuesto de interés en la fase superior y la fase inferior, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$K = \frac{C_{TPi}}{C_{BPi}} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

donde C_{TPi} (mg/L) es la concentración del compuesto de interés *i* en la fase superior y C_{BPi} (mg/L) es la concentración del compuesto de interés *i* en la fase inferior.

La eficiencia de extracción (%EE), definida como la relación entre la masa del compuesto de interés *i* en la capa superior y la suma de las masas del compuesto de interés entre las dos fases, fue determinada como:

$$\%EE = \frac{C_{TPi} \times V_{TP}}{C_{TPi} \times V_{TP} + C_{BPi} \times V_{BP}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.2}$$

donde V_{TP} y V_{BP} son los volúmenes de las fases superior e inferior respectivamente.

3.3 Métodos analíticos

3.3.1 Determinación del contenido en fenoles totales

El contenido total de fenoles se determinó por el método Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). A 0,5 mL de la disolución del extracto, se le agregaron 2,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, previamente diluido en agua destilada (1:10, v/v), y 2 mL de disolución acuosa de carbonato de sodio (75 g/L). La mezcla se mantuvo 5 min a 50°C en un bloque térmico, luego se la dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Spectronic Milton Roy 1201. El contenido de fenoles se determinó a partir de la recta de calibrado preparada con disoluciones estándar de ácido gálico (2-40 mg/L) y se expresó el resultado como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/mg de biomasa sobre base seca (b.s). La recta de calibrado se presenta en la Fig. 3.2. La determinación de fenoles totales se realizó por triplicado.

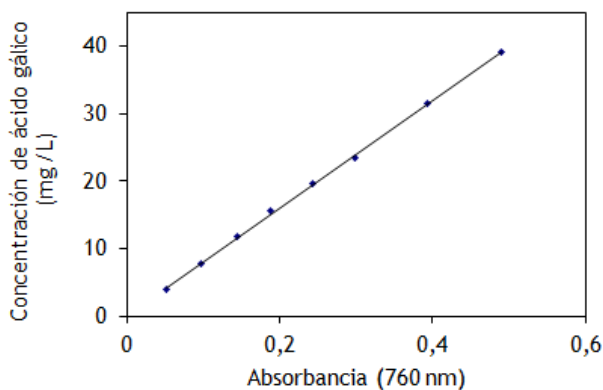


Fig. 3.2 Curva de calibración de ácido gálico utilizada para determinar el contenido total de fenoles

3.3.2 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en los extractos

3.3.2.1 Análisis por HPLC-ESI-TOF (“Cromatografía líquida de alta resolución-ionización por electrospray-tiempo de vuelo”)

La identificación de los compuestos fenólicos en los extractos de biomasa obtenidos se realizó por HPLC-ESI-TOF utilizando un equipo de HPLC Agilent Technologies 1100 y un espectrómetro acoplado Bruker Microtof ESI-TOF. Los compuestos fueron separados usando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 5 μ m (4,6 x 150 mm) (Agilent Technologies) y un gradiente binario en ácido acético acuoso de 2% para la fase móvil A y 0,5% de ácido acético en agua/acetonitrilo (1:1, v/v) para la fase móvil B con un caudal de 1 mL/min. El gradiente lineal fue del 10 al 55% de B desde 0 a 50 min, del 55 al 100% de B desde 50 a 60 min y del 100% al 10% de B desde 60 a 65 min. El análisis de espectrometría de masas fue llevado a cabo en modo de ionización negativa bajo las siguientes condiciones: analizador TOF (Tiempo de vuelo), fuente de ionización ESI (Electrospray), voltaje capilar de +4,5 kV, presión del gas nebulizador de 32 psi, flujo de gas seco de 12 L/min, volumen de inyección de 10

μL . Para identificar los compuestos presentes en los extractos analizados se realizó el análisis de HPLC-ESI-TOF a los siguientes compuestos standard: (+)-catequina hidratada, (-)-epicatequina, procianidina B2, quercetina-3-U-D glucósido, quercetina-3-o-rhamnosido, ácido elágico, isorhamnetina, kaempferol y ácido tánico, galocatequina y (-)-ácido gálico. Las muestras y los estándares fueron disueltos en agua en un rango de concentración de 100-200 ppm. Todos los disolventes fueron de grado HPLC.

3.3.2.2 Análisis por HPLC-DAD (“Cromatografía líquida de alta resolución-acoplado a un detector de diodos”)

La identificación y cuantificación del ácido ferúlico (FA) y *p*-cumárico (CA) se realizó en un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC Shimadzu) acoplado a un detector de diodos DAD. El equipo consta de dos bombas (Shimadzu LC 10 AD VP), horno (Shimadzu CTO-10 AC VP), detector DAD (Shimadzu DAD SPD-M10A VP), controlador del sistema (SCL-10 AVP) e inyector automático (Shimadzu SIL 10 AD VP). El sistema fue monitorizado y controlado por el software Class VP, versión 5.04. Los compuestos fenólicos de los extractos fueron monitorizados a 320 nm y la separación de éstos se realizó en una columna C18 de fase reversa Waters Spherisorb 5 μm ODS2 (4.6 mm \times 250 mm), precolumna (50 mm \times 4.6 mm ID). La elución fue isocrática, el flujo de la fase móvil fue de 1,0 mL/min, usando una composición de acetonitrilo agua (20:80) (v/v) y 1% de ácido acético. El volumen de inyección fue de 20 μL , las muestras concentradas fueron diluídas en la fase móvil (Tilay *et al.*, 2008)

Para identificar los compuestos presentes en los extractos analizados se realizó el análisis de los siguientes compuestos standard: FA y CA. La identificación de cada compuesto se realizó con una combinación del tiempo de retención y el espectro. Se expresó el resultado como mg de ácido fenólico/g de biomasa sobre base seca (b.s). Las curvas de calibración de los estándares fueron preparados en un rango de 25-250 $\mu\text{g/mL}$, disueltos en la fase móvil. Todos los disolventes fueron de grado HPLC

3.3.3 Evaluación de la actividad antioxidante

3.3.3.1 Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

El método FRAP fue realizado de acuerdo a Szöllösi & Szöllösi-Varga (2002). A 0,1 mL de la disolución acuosa de extractos se le añadió 3 mL de reactivo FRAP preparado en el momento de su utilización. (25 mL de disolución tampón de acetato, 300 mmol/L, pH=3,6; 2,5 de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina), 10 mmol/L en 40 mmol/L de HCl; 2,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mmol/L). La mezcla se mantuvo en un bloque térmico a 25 °C durante 5 minutos, y luego se midió a 593 nm en un espectrofotómetro Spectronic Milton Roy 1202, utilizando como blanco una disolución preparada de la misma forma pero con agua destilada. La actividad antioxidante se determinó a partir de la recta de calibración con L-ácido ascórbico que se obtuvo con disoluciones de L-ácido ascórbico de concentración conocida (0,1-1 mmol/L) (Ver Fig.

3.3). Los resultados se expresaron en nm equivalentes de ácido ascórbico (EAA)/ mg de biomasa b.s. Los análisis se hicieron por triplicado.

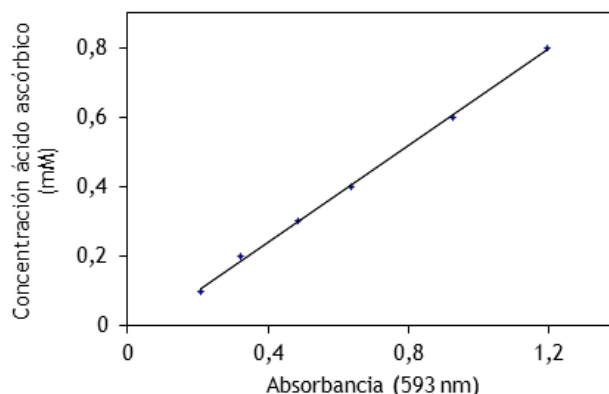


Fig. 3.3 Curva de calibración de ácido ascórbico para la determinación del poder antioxidante en la reducción del hierro (FRAP)

3.3.3.2 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil)

El procedimiento aplicado se basa en el método propuesto por Barreira *et al.*, (2008) con algunas modificaciones. Está basado en la decoloración, que mide la disminución de la absorbancia a 515-528 nm producida por la adición de un antioxidante al radical DPPH. Se preparan disoluciones acuosas de los extractos a distintas concentraciones. Se mezclan 0,3 mL de la disolución de extracto con 2,7 mL de disolución recién preparada de DPPH ($6,0 \times 10^{-5}$ M en metanol al 80%). La mezcla se agita vigorosamente y se mantiene en reposo y oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente. Entonces se mide la absorbancia de las muestras en una longitud de onda de 517 nm en un espectrofotómetro Spectronic Milton Roy 1201. A partir de los valores de la absorbancia se determina el porcentaje de inhibición del radical (%RI) aplicando la siguiente ecuación, donde A_S es la absorbancia de la disolución de extractos y A_0 es la absorbancia de la disolución control preparada sin extractos.

$$\%RI = \frac{(A_0 - A_S)}{A_0} \times 100$$

Ecuación 3.3

Como antioxidante de referencia se utiliza Trolox y los resultados se expresan como μmol equivalentes de Trolox (TRE)/g de biomasa b.s a partir de la recta de calibrado que se obtiene de la representación del porcentaje de inhibición (%RI) obtenido para el Trolox frente a la concentración de la disolución (0,04-0,3 mM) (Ver Fig. 3.4).

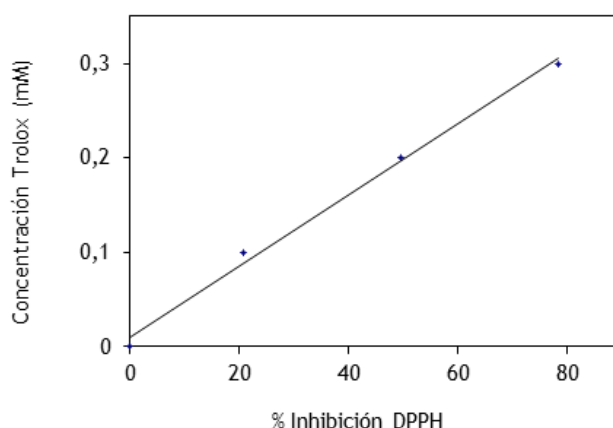


Fig. 3.4 Curva de calibración de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox de los extractos. Método DPPH.

3.3.3.3 Método ABTS ((2,2'-azino-di(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico))

El procedimiento aplicado se basa en el método propuesto por Re *et al.*, 1999. En primer lugar se produce la inducción del radical $ABTS^{\cdot+}$ por reacción de una disolución de ABTS (7mM en agua) con persulfato potásico (2,45 mM), manteniendo la mezcla a temperatura ambiente y oscuridad durante 16 h. Para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos, la disolución de $ABTS^{\cdot+}$ se diluye con agua hasta que la absorbancia a 734 sea de 0,7. Se mezclan 25 μ L de la disolución acuosa de extractos (preparadas a distintas concentraciones) con 2,5 mL de la disolución de $ABTS^{\cdot+}$. La mezcla se agita y se mantiene en reposo y oscuridad durante 6 minutos a temperatura ambiente. Entonces se mide la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 734 nm en un espectrofotómetro Spectronic Milton Roy 1201. Tal y como se indicó en el método DPPH se calcula el porcentaje de inhibición del radical $ABTS^{\cdot+}$ y el equivalente en Trolox de los extractos (TRE). La recta de calibrado se obtiene de la representación del porcentaje de inhibición frente a la concentración de Trolox (0,1-2mM). (Ver Fig. 3.5)

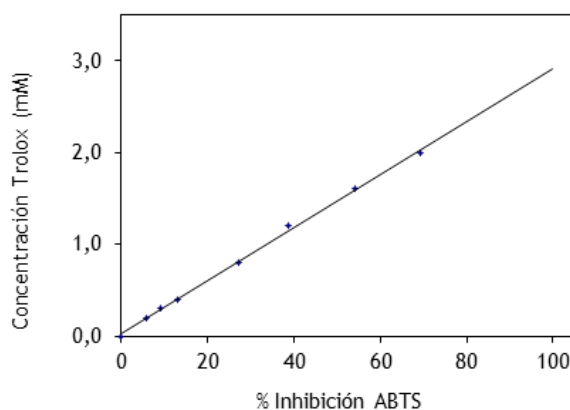


Fig. 3.5 Curva de calibración de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox de los extractos. Método ABTS.





4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1 Extracción de compuestos fenólicos de restos de cizallado de chapas de eucalipto

Se estudió la recuperación de compuestos fenólicos a partir de restos de cizallado de *Eucalyptus globulus* mediante dos tipos de ATPS. Por un lado, ATPS basados en PEG 2000, agua y diferentes sales ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ y $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), y por otro lado ATPS basados en etanol, agua y sales ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 y el tampón $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$).

4.1.1 Estudio de la extracción con ATPS basados en PEG 2000+sales

4.1.1.1 Influencia del tiempo de sedimentación en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

En una primera etapa se realizaron extracciones para estudiar el tiempo de sedimentación y para poder asegurar una separación de fases completa. Se ha verificado que la separación de fases en los sistemas ATPS formados con polímeros, agua y sales no es tan rápida como los sistemas de extracción líquido-líquido formados con compuestos orgánicos y agua. Así, el tiempo para que se logre una separación eficaz puede variar desde unos minutos hasta unas horas debido a la diferencia de densidades entre las dos fases (entre 0,5–0,15 g/cm³) (Hatti-Kaul, 2000).

Para estudiar la influencia del tiempo de sedimentación las extracciones fueron realizadas a 45°C durante 90 minutos, con una relación S/L de 1:10 (g/g). La selección de las variables y sus intervalos fueron seleccionados en base a estudios anteriores realizados con el mismo residuo mediante extracciones convencionales con etanol y una mezcla de etanol-agua (Fernández-Agulló *et al.*, 2015). Se seleccionaron dos sales para realizar el estudio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ correspondientes a los sistemas 2 y 12 respectivamente (Ver Tabla 3.1). Los tiempos de sedimentación seleccionados se encuentran en la Tabla 4.1.

En la Tabla 4.1 se muestra el contenido total de fenoles (TPC) en la fase superior (rica en polímero) y en la fase inferior (rica en sal). Se observa que para ambos sistemas estudiados los fenoles se concentran en la capa rica en polímero. Para el sistema PEG 2000+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ la concentración de fenoles en la fase rica en polímero disminuyó desde 2462±51 mg EAG/L para un tiempo de sedimentación de 1 hora a 2360±113 mg EAG/L para 15 h, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. Lo mismo ocurrió para el sistema PEG 2000+ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$. La concentración en la fase superior fue de 2979±243 mg EAG/L para un tiempo de sedimentación de 1 hora y 2861±124 mg EAG/L para 8 h, sin diferencia significativa entre ambos.

Por otra parte, se observa que el coeficiente de reparto, K, aumenta con el tiempo de sedimentación. En consecuencia, se puede decir que el equilibrio termodinámico no se ha alcanzado en las condiciones ensayadas. Aunque desde el punto de vista industrial, sería necesario evaluar si el aumento que se alcanza en el rendimiento compensa trabajar con un tiempo de sedimentación mayor, se ha elegido un tiempo de 1 h para el resto de los experimentos del apartado 4.1.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.1

Influencia del tiempo de sedimentación en la recuperación y partición de fenoles en los ATPS basados en PEG 2000 y sal. (temperatura, 45°C; S/L, 1:10; tiempo de extracción, 90 min)

| Tiempo de sedimentación (h) | TPC _{TP} (mg EAG/ L) | TPC _{BP} (mg EAG/ L) | K |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-----------|
| PEG 2000-(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sistema 2) | | | |
| 1 | 2462 ^a ±51 | 34,7 ^a ±0,4 | 71,0±1,5 |
| 4 | 2459 ^a ±50 | 30,0 ^b ±1,3 | 82,0±1,9 |
| 8 | 2377 ^a ±153 | 26,6 ^{bc} ±2,0 | 89,4±1,7 |
| 15 | 2360 ^a ±113 | 24,0 ^c ±1,9 | 98,3±15,9 |
| PEG 2000- Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (Sistema 12) | | | |
| 1 | 2979 ^a ±243 | 55,8 ^a ±4,6 | 53,7±6,9 |
| 8 | 2861 ^a ±124 | 50,5 ^a ±3,7 | 56,8±1,6 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). TPC: Contenido total de fenoles; TP: Fase superior; BP: Fase inferior

4.1.1.2 Influencia de la temperatura en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

Para analizar la influencia de la temperatura, las extracciones de los compuestos fenólicos fueron realizadas con los ATPS previamente seleccionados (Tabla 4.2) por 90 minutos, con una relación sólido/líquido de 1:10.

Un aumento en la temperatura aumenta la longitud de la recta de reparto (LRR), y también aumenta la pendiente de la misma, por lo que la composición de las fases en el equilibrio cambia significativamente (Voros *et al.*, 1993; Willauer *et al.*, 2000). Como consecuencia la concentración de polímero en la fase superior aumenta, mientras que la concentración de sal en la fase inferior baja.

En la Tabla 4.2, se observa en general, que al aumentar la temperatura, la relación de volúmenes y la constante de reparto disminuye. La disminución del V_r del sistema puede provocar fenómenos de saturación que puedan existir, disminuyendo la K en el sistema.

Por otro lado, al aumentar la temperatura el rendimiento total de fenoles, expresado como mg EAG sobre 100 mg madera b.s, aumenta en las dos fases. Este comportamiento se puede explicar porque al aumentar la temperatura aumenta la velocidad de difusión y la solubilidad de las sustancias extraídas (Jokić *et al.*, 2010). Como se explicó previamente, un aumento de la LRR, favorece una mayor concentración de polímero en la fase superior. Mientras mayor es la concentración de polímero en la fase superior, mayor es el volumen excluido (menor volumen libre) del mismo, por lo tanto se tiene una mayor hidrofobicidad en la fase superior (Benavides & Rito-Palomares, 2008).

En consecuencia, para todos los sistemas estudiados (2, 5, 9 y 12), al aumentar la temperatura aumenta el rendimiento total de fenoles y disminuye la selectividad (K menor). Basándose en el rendimiento total de fenoles, se seleccionó una temperatura de 65°C para el resto de los experimentos del apartado 4.1.1.

Tabla 4.2

Rendimiento total de fenoles y constante de reparto en función de la temperatura (tiempo de sedimentación, 1 h; S/L, 1:10; tiempo de extracción, 90 min)

| PEG 2000-(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sistema 2) | | | | | | |
|---|--|--|------------------|------------------|-----------|----------------|
| Temperatura (°C) | TPY _{TP} (mg EAG/ 100 mg madera b.s) | TPY _{BP} (mg EAG/ 100 mg madera b.s) | pH _{TP} | pH _{BP} | K | V _r |
| 25 | 0,69 ^a ±0,06 | 0,009 ^a ±0,000 | 4,3 | 4,2 | 102,6±8,3 | 0,7 |
| 45 | 0,79 ^a ±0,01 | 0,020 ^b ±0,001 | 4,3 | 4,0 | 71,0±1,5 | 0,6 |
| 65 | 1,21 ^b ±0,03 | 0,036 ^c ±0,001 | 4,2 | 3,9 | 79,8±2,7 | 0,4 |
| PEG 2000-KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (Sistema 5) | | | | | | |
| 25 | 0,52 ^a ±0,02 | 0,016 ^a ±0,001 | 7,9 | 7,8 | 56,1±7,5 | 0,6 |
| 45 | 0,88 ^b ±0,02 | 0,040 ^b ±0,006 | 7,9 | 7,9 | 53,8±1,1 | 0,5 |
| 65 | 0,91 ^b ±0,07 | 0,070 ^a ±0,004 | 7,9 | 7,7 | 33,8±3,6 | 0,4 |
| PEG 2000-K ₂ HPO ₄ (Sistema 9) | | | | | | |
| 25 | 0,52 ^a ±0,03 | 0,010 ^a ±0,002 | 9,8 | 9,8 | 52,5±0,1 | 1,2 |
| 45 | 0,83 ^b ±0,09 | 0,025 ^b ±0,002 | 9,7 | 9,6 | 34,9±0,5 | 1,0 |
| 65 | 1,62 ^c ±0,10 | 0,090 ^c ±0,003 | 9,6 | 9,3 | 21,7±0,2 | 0,8 |
| PEG 2000-Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (Sistema 12) | | | | | | |
| 25 | 0,76 ^a ±0,09 | 0,010 ^a ±0,000 | 7,9 | 7,9 | 91,8±5,4 | 0,9 |
| 45 | 0,96 ^b ±0,04 | 0,028 ^b ±0,002 | 7,7 | 7,8 | 53,7±6,9 | 0,7 |
| 65 | 1,29 ^c ±0,02 | 0,064 ^c ±0,002 | 7,3 | 7,1 | 38,0±0,8 | 0,5 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). TPY: Rendimiento total de fenoles; TP: Fase superior; BP: Fase inferior; K: constante de reparto; V_r: relación de volúmenes

4.1.1.3 Influencia de la sal inorgánica en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

Este trabajo utiliza un material con una composición compleja, debido a que posee una gran variedad de extractos, entre ellos distintos compuestos fenólicos con diferentes pesos moleculares.

En estos ATPS, el mecanismo de partición no está del todo comprendido. La partición de las moléculas involucra diferentes interacciones físicas y químicas que hace difícil poder predecir el comportamiento de las mismas. Además la migración de las moléculas para la capa superior o inferior depende de diferentes propiedades del sistema como la cantidad y tipo de sal, el pH, etc.

Esto ha llevado a tratar de implementar estrategias dirigidas a seleccionar el tipo de ATPS y los parámetros del sistema que resulten en un mejor rendimiento y recuperación de compuestos fenólicos y además que permitan predecir la migración de las moléculas. Debido a la complejidad del sistema, es difícil definir un pH inicial para la extracción, porque va depender de la sal seleccionada para el sistema PEG 2000+sal+agua.

Por este motivo se seleccionaron diferentes sales para cubrir distintos rangos de pH: (NH₄)₂SO₄, una solución tampón formada por KH₂PO₄/K₂HPO₄, K₂HPO₄ y Na₃C₆H₅O₇. Las diferentes sales confieren diferentes pH a los sistemas ATPS, en un intervalo de 5 a 10, siendo alrededor de 5,2; 7,7; 10,1 y 9,1 para (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄/K₂HPO₄, K₂HPO₄ y Na₃C₆H₅O₇ respectivamente (Ver Tabla 3.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la Tabla 4.2, después del proceso de extracción con los sistemas seleccionados, el pH final de ambas fases decreció, a excepción del sistema PEG 2000/K₂HPO₄/KH₂PO₄, debido a sus características de disolución tampón. No obstante, se mantuvieron las condiciones alcalinas luego de la extracción para los sistemas PEG 2000/K₂HPO₄ y PEG 2000/Na₃C₆H₅O₇. La disminución del pH se debe seguramente a que los extractos de la madera de eucalipto tienen características ácidas (ácidos grasos, ácidos carboxílicos, ácidos fenólicos, etc.) y además muchos de estos compuestos pueden ser productos de hidrólisis que se forman durante la extracción (Rowell *et al.*, 2013).

Una gran variedad de compuestos fenólicos presentan anfoterismo (ácido gálico, ácido elágico, ácido ferúlico, etc), pueden comportarse como un ácido o una base y, por tanto, liberar o retirar protones (H⁺) del medio donde se encuentran. Cuando el pH está por debajo del pK_a, los compuestos fenólicos están principalmente bajo su forma molecular, la cual es más hidrofóbica que la disociada. De este modo, la partición de los compuestos fenólicos entre la capa superior y la inferior puede explicarse considerando las interacciones hidrofóbicas e interacciones por puente de hidrógeno entre los compuestos fenólicos y las componentes del PEG (Shen *et al.*, 2006).

Para todos los ATPS estudiados (Tabla 3.1), la capa inferior, rica en sal, es más hidrófila, mientras que la capa superior, rica en PEG, es más hidrofóbica. De esta forma, el compartimiento de partición se ve afectado por esta a diferencia de las polaridades entre las capas formadas, y por la forma en que se encuentran los compuestos fenólicos, cargados o no cargados. Por ello es de esperar que trabajando a pH bajos, aumente la afinidad de los fenoles por la capa superior.

Como se observa en la Tabla 4.2 y la Figura 4.1, los fenoles se concentran en la capa más hidrofóbica, con valores altos de coeficiente de reparto (K>1). Esta preferencia de los compuestos fenólicos por la capa rica en polímero ya ha sido explicada previamente (Salic *et al.*, 2011).

Además, como se observa en las Figuras 4.1 y 4.2, los sistemas compuestos por PEG 2000/(NH₄)₂SO₄, con pH ácido, son los que presentan mayor selectividad (mayor K) con valores de K comprendidos entre 45 y 117. Por otra parte, los valores de K obtenidos con los sistemas formados con las sales de fosfato (tampón) y las de citrato, que presentan valores similares del pH final, son similares entre sí, (24,9-39,9) y (31,5-46,7), respectivamente. Finalmente se observa, que los valores más bajos de K fueron obtenidos con el sistema PEG 2000/K₂HPO₄ (14,2-21,7), lo que podría deberse a que el sistema trabaja con un pH más alto y por lo tanto una menor hidrofobicidad en el sistema.

Si el tipo y la concentración de la sal en la capa inferior son apropiadas para interactuar con la mayoría de las moléculas de agua vía hidratación, las interacciones con las moléculas de fenoles y el agua disminuyen. En consecuencia, la molécula migra a la fase superior, mientras haya el lugar suficiente para esto (Gomes *et al.*, 2009).

La denominada serie Hofmeister clasifica los iones en función de su capacidad de cambiar la estructura del agua. Los efectos de estos cambios fueron estudiados y

categorizados a finales del siglo XIX por Franz Hofmeister, en base a la capacidad que tenían las sales para estructurar o desestructurar el agua. Aunque, el mecanismo de la serie de Hofmeister no está perfectamente claro, algunos estudios recientes indican que los efectos de “salting out” o “salting in” están relacionados con la fuerza de las interacciones específicas entre los iones y las moléculas de agua. Así, mientras los iones “salting out” disminuyen la solubilidad de moléculas apolares, consolidando las interacciones hidrofóbicas, los iones “salting in” producen un aumento de la solubilidad de moléculas no polares, debilitando el efecto hidrofóbico (Zhang & Cremer, 2006, Ulloa *et al.*, 2012).

De acuerdo con la serie Hofmeister, los aniones citrato y el sulfato interactúan directamente con la estructura del agua, promoviendo el “salting out”. Sin embargo los valores de K obtenidos para los sistemas formados con estas sales difieren significativamente entre sí, siendo, como se ha visto, los valores obtenidos más altos para el sulfato. De la misma forma, comparando las sales de fosfato, que tienen el mismo catión, el mayor valor del coeficiente de reparto se obtiene con el sistema K_2HPO_4 - KH_2PO_4 . No obstante, el K_2HPO_4 tiende al efecto “salting out” mientras que el KH_2PO_4 promueve el régimen “salting-in” (Reis *et al.*, 2014). Por lo tanto, el fenómeno “salting out” no parece ser el fenómeno dominante a la hora de forzar la migración de los fenoles a la capa rica en PEG mientras que el pH del sistema sí parece ser que juega un papel importante en la partición observada.

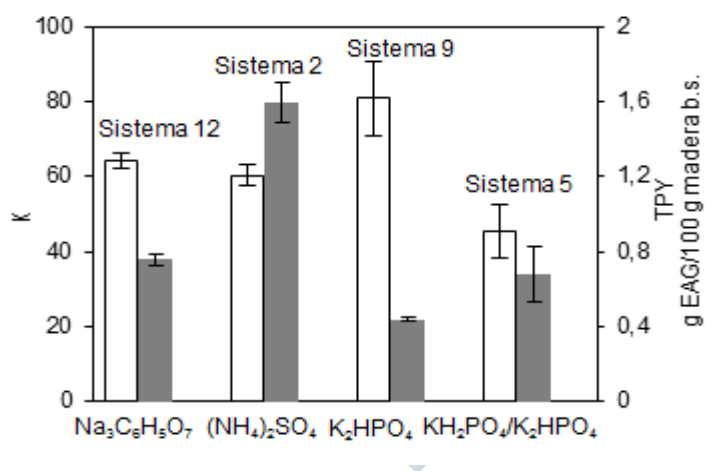


Fig. 4.1. Coeficiente de reparto, K (■), y rendimiento total de fenoles (□) en los ATPS basados en PEG 2000/sal bajo las siguientes condiciones de extracción (temperatura de extracción, 65°C; tiempo de sedimentación, 1h; S/L, 1:10).

4.1.1.4 Influencia de la composición de la alimentación en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

En esta etapa se realizaron las extracciones en las siguientes condiciones: 65°C, tiempo de extracción 90 minutos, tiempo de sedimentación 1 h y relación S/L 1:10. Para cada sistema PEG 2000/sal, se seleccionaron tres composiciones de alimentación diferentes (Tabla 3.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la Tabla 4.3, para los sistemas PEG 2000/(NH₄)₂SO₄ y PEG 2000/Na₃C₆H₅O₇ se trabajó con una relación de volúmenes aproximadamente constante para las tres composiciones seleccionadas y no se encontró diferencia significativa en el contenido total de fenoles de la capa superior. Por lo contrario, para los sistemas formados PEG 2000/ K₂HPO₄-KH₂PO₄ no se trabajó a volumen constante entre las fases, siendo la relación de volúmenes de los sistemas 5 y 6 significativamente mayor que la del sistema 4. Como se observa en la Tabla 4.3, no existe diferencia significativa en el contenido total de fenoles en la capa superior entre los sistemas 5 y 6, aunque el mayor valor se obtiene con el primero (0,91 mg EAG/100 mg madera b.s). Se puede concluir que el rendimiento de extracción en la capa superior se favorece por una mayor relación PEG 2000/sal y un mayor V_r.

Similar comportamiento se observa con el sistema PEG 2000/K₂HPO₄, a mayor relación de volúmenes y mayor relación PEG 2000/sal se obtiene mayor rendimiento de extracción. En este sistema, el contenido total de fenoles mayor se obtiene con el sistema 9 (1,62 mg EAG/100 mg madera b.s). Este fenómeno puede estar asociado, a que cuanto mayor es el volumen de la capa superior, disminuyen los problemas de saturación que puedan existir. Además, cuanto mayor sea la concentración de polímero, mayor es la hidrofobicidad de la capa superior, favoreciendo la migración de los compuestos fenólicos como ya se ha indicado previamente (Shen *et al.*, 2006; Willauer *et al.*, 2000).

Con respecto a la partición de los compuestos fenólicos, se observa que existe una tendencia similar en todos los sistemas (Fig 4.2), a medida que aumenta la longitud de la recta de reparto, el coeficiente de reparto aumenta. Esto se debe a que un aumento en la longitud de la recta de reparto, está asociado a un aumento en la concentración de sal y polímero en cada capa. Por tanto, se aumenta la hidrofobicidad de la capa superior y el efecto de volumen excluido favoreciendo la migración de los fenoles a la misma (Shen *et al.*, 2006; Willauer *et al.*, 2000; Benavides & Rito-Palomares, 2008; Simental-Martínez *et al.*, 2014; Salic *et al.* 2011; Rito Palomares, 2004).

4.1.1.5 Influencia del tiempo de extracción en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

En general, la recuperación de compuestos fenólicos depende del tiempo de extracción, obteniéndose los valores más altos del rendimiento de extracción operando a mayores tiempos (Jokic *et al.*, 2010).

Para estudiar la influencia del tiempo de extracción en la recuperación de compuestos fenólicos, se trabajó con dos de los sistemas ATPS ensayados: PEG 2000/(NH₄)₂SO₄ (Sistema 3) operando de 30 a 390 min y el sistema PEG 2000/Na₃C₆H₅O₇ (Sistema 12) con tiempos de 90 a 390 min.

Como se observa en la Tabla 4.4, el rendimiento total de fenoles en el sistema PEG2000/ (NH₄)₂SO₄ aumenta con el tiempo de extracción, de 0,74 mg EAG/ 100 mg madera b.s. a 30 min hasta 1,15 mg EAG/ 100 mg madera b.s. a 90 min. Sin embargo, aumentando el tiempo de extracción a valores de hasta 390 min no se logra un aumento significativo.

En el caso del sistema PEG 2000/ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, no se observa una mejora significativa del contenido total de fenoles con el tiempo de extracción. Como consecuencia de los resultados, se considera que con 90 min de tiempo de extracción es suficiente para conseguir un alto rendimiento de extracción.

Tabla 4.3

Rendimiento total de fenoles en función de la composición de la alimentación (tiempo de sedimentación, 1 h; temperatura, 65°C; S/L, 1:10; tiempo de extracción, 90 min)

| PEG 2000- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | | | | |
|---|--|---|--------------------------|----------------|
| Sistema | TPY _{TP} (mg EAG /100 mg madera b.s) | TPY _{BP} (mg EAG /100 mg madera b.s) | Relación PEG 2000/sal | V _r |
| 1 | 1,27 ^a ±0,15 | 0,079 ^a ±0,003 | 1,05 | 0,3 |
| 2 | 1,21 ^a ±0,03 | 0,037 ^b ±0,001 | 1,28 | 0,4 |
| 3 | 1,15 ^a ±0,09 | 0,030 ^c ±0,002 | 1,15 | 0,3 |
| PEG 2000- $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ | | | | |
| 4 | 0,64 ^a ±0,06 | 0,196 ^a ±0,007 | 0,44 | 0,1 |
| 5 | 0,91 ^b ±0,07 | 0,068 ^b ±0,004 | 0,82 | 0,4 |
| 6 | 0,79 ^{ab} ±0,06 | 0,050 ^c ±0,003 | 0,80 | 0,4 |
| PEG 2000- K_2HPO_4 | | | | |
| 7 | 1,11 ^a ±0,05 | 0,177 ^a ±0,010 | 1,19 | 0,4 |
| 8 | 1,24 ^b ±0,12 | 0,117 ^b ±0,000 | 1,41 | 0,5 |
| 9 | 1,62 ^b ±0,10 | 0,090 ^c ±0,003 | 2,09 | 0,8 |
| PEG 2000- $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ | | | | |
| 10 | 1,29 ^a ±0,14 | 0,084 ^a ±0,008 | 1,14 | 0,5 |
| 11 | 1,21 ^a ±0,07 | 0,052 ^{bc} ±0,001 | 1,22 | 0,5 |
| 12 | 1,29 ^a ±0,02 | 0,064 ^c ±0,002 | 1,25 | 0,5 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). TPY: Rendimiento total de fenoles; TP: Fase superior; BP: Fase inferior

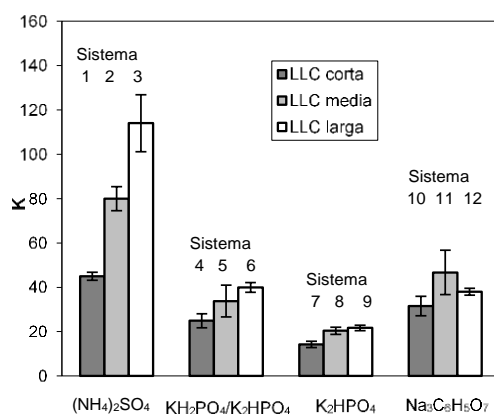


Fig 4.2. Coeficiente de reparto, K, en distintos PEG2000/sal ATPS en función de la longitud de la recta de reparto (LRR) (temperatura de extracción, 65°C; tiempo de sedimentación, 1 h; S/L, 1:10)

4.1.1.6 Influencia de la relación sólido/líquido en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

La extracción de compuestos fenólicos generalmente es influenciada por la relación sólido/líquido (Pin *et al.*, 2006). Esto es consistente con los principios de transferencia

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de materia, dado que la fuerza impulsora es el gradiente de concentración entre el sólido y el seno del fluido, el cual es mayor, cuando se utiliza una menor relación sólido/líquido (Radojkovic *et al.*, 2012).

Tabla 4.4

Rendimiento total de fenoles en función del tiempo de extracción (tiempo de sedimentación, 1 h; temperatura de extracción, 65°C; S/L, 1:10)

| PEG2000-(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sistema 3) | | |
|---|--|--|
| Tiempo de extracción (min) | TPY _{TP} (mg EAG /100 mg madera b.s) | TPY _{BP} (mg EAG /100 mg madera b.s) |
| 30 | 0,74 ^a ±0,16 | 0,022 ^a ±0,001 |
| 90 | 1,15 ^b ±0,09 | 0,030 ^b ±0,002 |
| 270 | 1,25 ^b ±0,17 | 0,049 ^c ±0,003 |
| 390 | 1,32 ^b ±0,14 | 0,051 ^c ±0,003 |
| PEG 2000- Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (Sistema 12) | | |
| 90 | 1,29 ^a ±0,02 | 0,0635 ^a ±0,0019 |
| 210 | 1,51 ^a ±0,13 | 0,0887 ^a ±0,0063 |
| 270 | 1,70 ^a ±0,22 | 0,0982 ^a ±0,0088 |
| 330 | 1,61 ^a ±0,10 | 0,1091 ^a ±0,0006 |
| 390 | 1,67 ^a ±0,23 | 0,1100 ^a ±0,0033 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). TPY: Rendimiento total de fenoles; TP: Fase superior; BP: Fase inferior

Para estudiar la influencia de la relación S/L sobre la extracción se eligieron los sistemas: PEG 2000/ (NH₄)₂SO₄, PEG 2000/ KH₂PO₄/K₂HPO₄ y PEG 2000/K₂HPO₄. Las extracciones se realizaron a 65°C, por 90 min y el tiempo de sedimentación fue de 1 h y modificando la relación sólido/ líquido de 0,2:10 a 1,5:10 (g/g).

Los resultados se muestran en la Tabla 4.5. Para el sistema PEG 2000/(NH₄)₂SO₄ el contenido en fenoles en la capa superior no cambian significativamente cuando la relación S/L varía entre 0,2:10 a 1:10 pero luego disminuye cuando la relación sólido/líquido aumenta a 1,5:10 (g/g). Para el sistema PEG 2000/K₂HPO₄-KH₂PO₄, existen diferencias significativas en el contenido total de fenoles, disminuyendo al aumentar la relación S/L. Por lo contrario, para el sistema PEG 2000/K₂HPO₄, solo se encontraron diferencias significativas con la relación S/L más alta.

Desde el punto de vista del proceso, el empleo de una mayor cantidad de disolvente y, como consecuencia, la obtención de unos extractos más diluidos, no produce mejoras significativas en el rendimiento de extracción, por lo que, se considera adecuado trabajar con una relación 1:10 (g/g).

4.1.1.7 Caracterización de los extractos por espectroscopia de masas HPLC-ESI-TOF

Para comprobar la presencia de compuestos fenólicos e identificarlos en los extractos, se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas. El análisis se realizó en los extractos la capa superior de los sistemas seleccionados a 65°C (Sistema 1: PEG 2000/(NH₄)₂SO₄; sistema 5: PEG 2000/ KH₂PO₄/K₂HPO₄; sistema 12: PEG 2000/Na₃C₆H₅O₇).

Tabla 4.5

Rendimiento total de fenoles en función de la relación S/L (tiempo de sedimentación, 1 h; temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción 90 min)

| PEG2000-(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sistema 3) | | |
|---|--|--|
| Relación (S/L) | TPY _{TP} (mg EAG /100 mg madera b.s) | TPY _{BP} (mg EAG /100 mg madera b.s) |
| 0,2:10 | 1,88 ^a ±0,04 | 0,046 ^a ±0,013 |
| 0,5:10 | 1,64 ^a ±0,09 | 0,045 ^a ±0,004 |
| 0,7:10 | 1,59 ^a ±0,08 | 0,043 ^a ±0,002 |
| 1,0:10 | 1,25 ^{ab} ±0,17 | 0,049 ^a ±0,003 |
| 1,2:10 | 0,84 ^{bc} ±0,01 | 0,042 ^a ±0,001 |
| 1,5:10 | 0,55 ^c ±0,05 | 0,037 ^a ±0,002 |
| PEG2000- KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (Sistema 5) | | |
| 0,2:10 | 1,27 ^a ±0,03 | 0,068 ^a ±0,009 |
| 0,5:10 | 1,02 ^b ±0,08 | 0,070 ^a ±0,001 |
| 1,0:10 | 0,91 ^b ±0,07 | 0,068 ^a ±0,004 |
| 1,5:10 | 0,60 ^c ±0,04 | 0,066 ^a ±0,004 |
| PEG2000- K ₂ HPO ₄ (Sistema 9) | | |
| 0,2:10 | 1,80 ^a ±0,14 | 0,161 ^a ±0,019 |
| 0,5:10 | 1,90 ^a ±0,06 | 0,135 ^b ±0,002 |
| 1,0:10 | 1,62 ^{ac} ±0,10 | 0,090 ^c ±0,002 |
| 1,5:10 | 1,33 ^c ±0,16 | 0,074 ^d ±0,003 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). TPY: Rendimiento total de fenoles; TP: Fase superior; BP: Fase inferior

Se presentan los cromatogramas para los distintos sistemas en las Figuras 4.3-4.5. En la Tabla 4.6 se muestran los compuestos identificados mediante RP-HPLC-ESI-TOF.

Estos compuestos se encuentran habitualmente en la corteza y hojas de eucalipto (Conde *et al.*, 1996; Eyles *et al.*, 2003), siendo el ácido elágico el que predomina en todos ellos. Todos los compuestos identificados tienen actividad antioxidante demostrada (Moure *et al.*, 2001; Romani *et al.*, 1999). Además, el ácido elágico y la quercetina tienen propiedades anticancerígenas, produciendo la inducción para detener el ciclo celular y apoptosis, y también inhibe la formación de tumores en los animales (Narayanan *et al.*, 1999; Mertens-Talcott, *et al.*, 2003)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.6

Compuestos fenólicos identificados en los extractos de madera de eucalipto en la fase superior para los Sistemas basados en PEG2000/sal en las siguientes condiciones (S/L, 1:10; temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h)

| PEG2000-(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sistema 1) (Fig. 4.3) | | |
|--|--------------------------|---------------------------|
| Compuesto | [M-H] ⁻ (m/z) | Tiempo de retención (min) |
| Mono galoil glucosa (3) | 331 ^a | 2,1 ^a |
| Di galoil glucosa (3) | 481 ^a | 2,1 ^a |
| (-)-Ácido gálico(4) | 169 ^a | 3,0 ^a |
| Ácido Elágico (13) | 301 ^a | 26,4 ^a |
| Quercetina 3-O- ramnósido (14) | 447 ^a | 32,6 ^a |
| Miricetina 3- O-ramnósido (11) | 463 ^b | 18,9 ^b |
| Quercetina 3-glucósido (11) | 463 ^b | 18,9 ^b |
| Quercetina 3-glucurónido(12) | 477 ^b | 26,0 ^b |
| Isorhamnetina (16) | 315 ^b | 34,8 ^b |
| PEG 2000 / K ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄ (Sistema 5) (Fig. 4.4) | | |
| Ácido Elágico (6) | 301 ^a | 26,4 ^a |
| Quercetina 3-O- ramnósido (7) | 447 ^a | 32,6 ^a |
| Miricetina 3- O-ramnósido (3,4) | 463 ^b | 19,0 ^b |
| Quercetina 3-glucósido (3,4) | 463 ^b | 19,0 ^b |
| Quercetina 3-glucurónido (5) | 477 ^b | 26,0 ^b |
| Isorhamnetina (8) | 315 ^b | 36,1 ^b |
| PEG 2000- Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (Sistema 12) (Fig. 4.5) | | |
| Mono galoil glucosa (3) | 331 ^a | 2,1 ^a |
| (-)-Ácido gálico (4) | 169 ^a | 3,0 ^a |
| Ácido Elágico (12) | 301 ^a | 26,4 ^a |
| Quercetina 3-O- ramnósido (13) | 447 ^a | 32,6 ^a |
| Hamamelitanino (5) | 483 ^b | 4,0 ^b |
| Miricetina 3- O-ramnósido (10) | 463 ^b | 19,0 ^b |
| Quercetina 3-glucósido (10) | 463 ^b | 19,0 ^b |
| Quercetina 3-glucurónido (11) | 477 ^b | 26,1 ^b |

a, según patrón; b, basados en el peso molecular

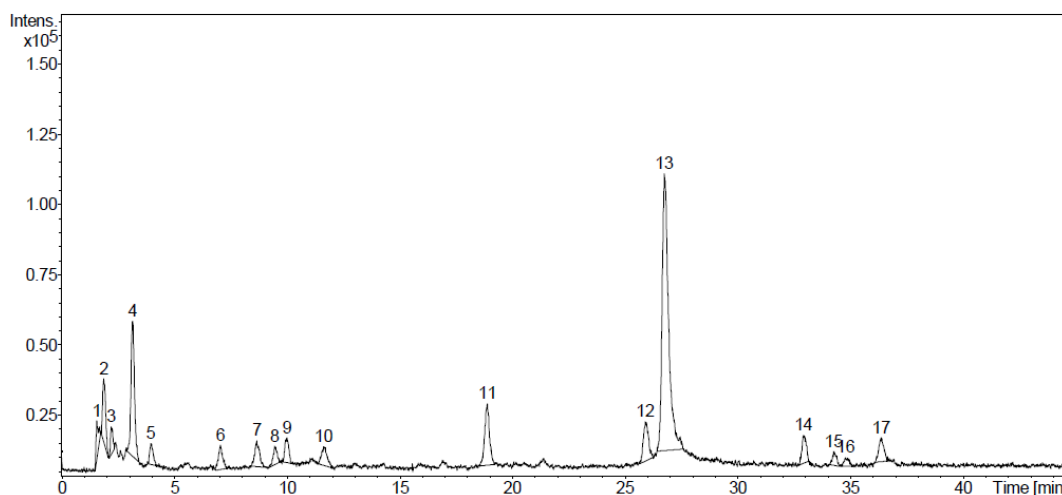


Fig 4.3. Cromatograma HPLC de los extractos de eucalipto en la fase superior bajo las siguientes condiciones: S/L, 1:10; temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h; Sistema 1 (PEG 2000/(NH₄)₂SO₄) Picos identificados: (3) mono- y di- galoil glucosa, (4) ácido gálico, (11) miricetina 3-O-ramnósido y quercetina-3 glucósido, (12) quercetina 3- glucurónido, (13) ácido elágico, (14) quercetina 3-O-ramnósido, (16) Isorhamnetina

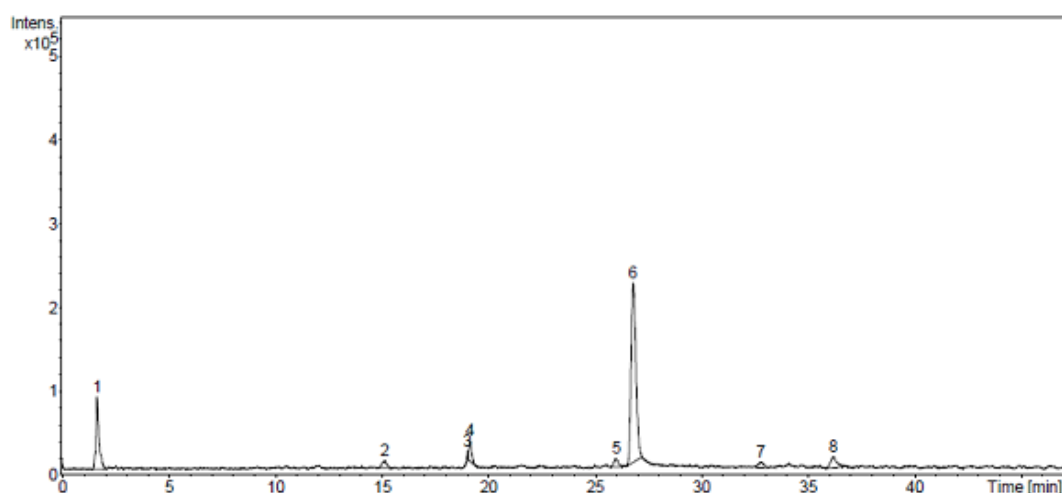


Fig 4.4. Cromatograma HPLC de los extractos de eucalipto en la fase superior bajo las siguientes condiciones: S/L, 1:10; temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h; Sistema 5 (PEG 2000/(K₂HPO₄-KH₂PO₄)) Picos identificados: (3,4) miricetina 3-O-ramnósido y quercetina-3 glucósido, (5) quercetina 3- glucurónido, (6) ácido elágico, (7) quercetina 3-O-ramnósido, (8) Isorhamnetina

4.1.2 Estudio de la extracción con ATPS basados en etanol+sales

4.1.2.1 Influencia del tiempo de sedimentación en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

Como se ha comentado en el apartado 4.1.1.1, el tiempo requerido para que las fases se separen pueden variar dependiendo de los componentes de cada sistema.

En una primera etapa, para realizar las extracciones a 25°C se seleccionó un sistema para cada tipo de ATPS basados en etanol + sales (Sistema 5, 7 y 11, Tabla 3.2), variando el tiempo de sedimentación en 1, 6 y 15 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

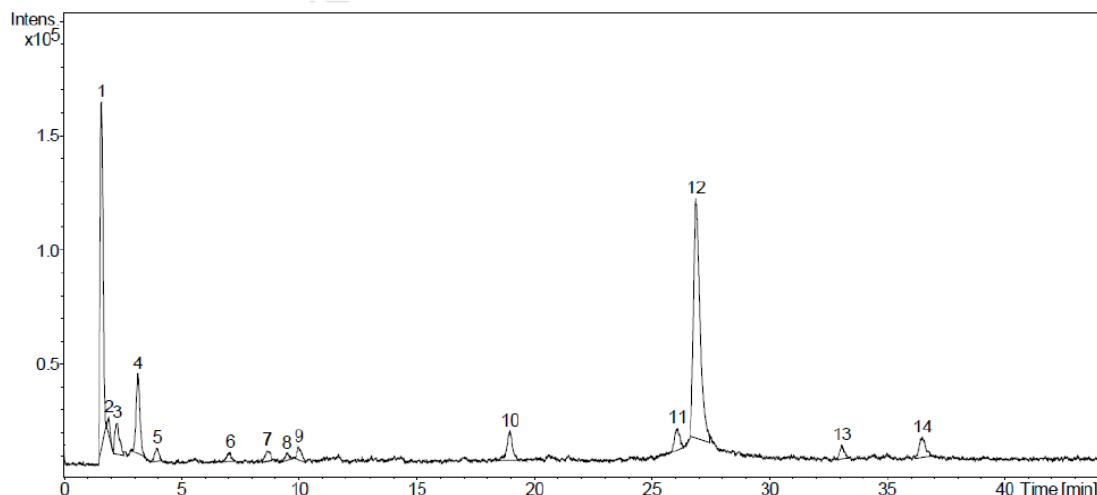


Fig 4.5. Cromatograma HPLC de los extractos de eucalipto en la fase superior bajo las siguientes condiciones: S/L, 1:10; temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h; Sistema 12 (PEG 2000/ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$). Picos identificados: (3) mono- glucosa, (4) ácido gálico, (5) Hamamelitanino, (10) miricetina 3-O-ramnósido y Quercetina 3- glucósido, (11) quercetina 3- glucurónido, (12) ácido elágico, (13) quercetina 3-O-ramnósido, (16) Isorhamnetina

En la Tabla 4.7 se muestran los resultados experimentales obtenidos a distintos tiempos de sedimentación, en la fase superior (rica en etanol) y en la fase inferior (rica en sal). Se observa que dependiendo de la sal seleccionada los fenoles se concentran en la capa rica en etanol o en la capa rica en sal. A excepción del sistema 7, se puede observar que no hay diferencia significativa en el rendimiento total de fenoles con el tiempo de sedimentación. El mayor rendimiento total de fenoles (2,81 mg EAG /100 mg de madera b.s) se obtuvo con el sistema etanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en la fase superior. Teniendo en cuenta estos resultados, se va considerar para el resto de los experimentos del apartado 4.1.2 que es suficiente con 1 h de tiempo de sedimentación para alcanzar el equilibrio termodinámico entre fases.

4.1.2.2 Influencia de la sal inorgánica en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

Para analizar la influencia de la sal inorgánica utilizada en la migración de los compuestos fenólicos en los ATPS basados en etanol-sales, se seleccionaron también tres de las sales ensayadas con el PEG: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, una disolución tampón formada por $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ y K_2HPO_4 . Las diferentes sales que confieren diferentes pH a los sistemas ATPS, siendo 5,2, 7,4 y 9,7, respectivamente (Tabla 3.2).

En todos los casos, al igual que sucedió como ya se explicó previamente (apartado 4.1.1.3) se observó que el pH decreció ligeramente para los sistemas formados con sulfato amónico y difosfato potásico, aunque se siguió manteniendo el carácter ácido o básico, respectivamente.

Como se observa en la Figura 4.6 y la Tabla 4.7, la partición de fenoles es diferente para los distintos ATPS estudiados, con valores del coeficiente de reparto que varían entre 0,14 y 2,97, dependiendo de la sal utilizada.

Tabla 4.7

Influencia del tiempo de sedimentación en la recuperación y partición de fenoles en los ATPS basados en etanol-sal. (temperatura de extracción, 25°C ; S/L, 1:10; tiempo de extracción, 90 min)

| Sistemas | Tiempo de sedimentación (h) | TPY _{TP} (mg EAG / 100 mg madera b.s) | pH _{TP} | TPY _{BP} (mg EAG / 100 mg madera b.s) | pH _{BP} |
|----------|-----------------------------|---|------------------|---|------------------|
| 5 | 1 | 2,62 ^a ±0,10 | 4,3 | 0,41 ^a ±0,01 | 4,3 |
| | 6 | 2,81 ^a ±0,10 | 4,5 | 0,43 ^a ±0,03 | 4,3 |
| | 15 | 2,67 ^a ±0,06 | 4,3 | 0,38 ^a ±0,00 | 4,5 |
| 7 | 1 | 0,20 ^a ±0,01 | 7,2 | 0,60 ^a ±0,13 | 7,1 |
| | 6 | 0,15 ^b ±0,00 | 7,2 | 0,58 ^a ±0,00 | 7,2 |
| | 15 | 0,14 ^b ±0,01 | 7,2 | 0,44 ^a ±0,02 | 7,2 |
| 11 | 1 | 0,09 ^a ±0,00 | 8,4 | 0,23 ^a ±0,02 | 8,5 |
| | 6 | 0,09 ^a ±0,01 | 8,3 | 0,23 ^a ±0,04 | 8,4 |
| | 15 | 0,09 ^a ±0,01 | 8,3 | 0,21 ^a ±0,04 | 8,5 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). TPY: Rendimiento total de fenoles; TP: Fase superior; BP: Fase inferior

También se observa que en condiciones ácidas los compuestos fenólicos migran para la capa superior ($K>1$), mientras que en condiciones neutras o alcalinas, los compuestos fenólicos migran para la capa inferior ($K<1$). Esto puede deberse a que las fases tienen diferentes polaridades entre sí y además que las moléculas fenólicas dependiendo del pH pueden estar cargadas negativamente o no (Shen *et al.*, 2006; Cláudio *et al.*, 2012). En los sistemas estudiados, una de las fases tiene características hidrofóbicas (capa rica en etanol) y la otra fase es más hidrofílica (capa rica en sal). Muchos compuestos fenólicos presentan anfoterismo como se mencionó en el apartado 4.1.1.3. Cuando las extracciones se realizan a pH neutro y básico, se puede asumir que mucho de los compuestos fenólicos están disociados (menor hidrofobicidad), por lo que se espera que migren a la capa inferior (Shen *et al.*, 2006). Si comparamos los ATPS formados por las sales de fosfato, se observa que el sistema formado por $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ presenta una mayor selectividad que el sistema ATPS formado con K_2HPO_4 , presentando un valor ligeramente menor de la relación K (Fig.4.6).

Esto puede deberse a que el sistema $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ posee una fuerza iónica más baja (mayor “salting in”) que el sistema que contiene K_2HPO_4 (Reis *et al.*, 2012). Para todos los sistemas ensayados, el mayor rendimiento se obtuvo en la fase inferior con el sistema etanol/ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 0,60 mg EAG por 100 mg de madera b.s. (Tabla 4.7).

4.1.2.3 Influencia de la longitud de la recta de reparto en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

Para estudiar la influencia de la longitud de la recta de reparto (LRR) se seleccionaron tres longitudes diferentes, con una relación de volumen (V_r) alrededor de 1 (Ver Tabla 2.2). Se recomienda un valor de $V_r=1$ para que no influyan los posibles efectos de concentración (Benavides & Rito-Palomares, 2008). Las extracciones se realizaron a una temperatura de extracción de 25°C por 90 min con una relación S/L de 1:10 y un tiempo de sedimentación de 1 h.

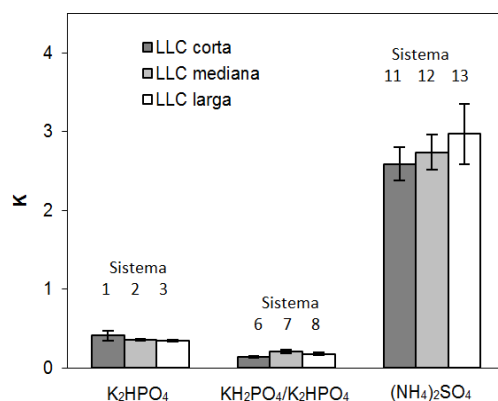


Fig. 4.6. Coeficiente de reparto, K, en distintos etanol/sal ATPS en función de la longitud de la recta de reparto (LRR) (temperatura de extracción: 25°C; tiempo de extracción: 90 min; tiempo de sedimentación: 1 h; S/L, 1:10).

Como se muestra en Figura 4.6, para el ATP formado por etanol / $(NH_4)_2SO_4$ el valor de K más alto se obtuvo con la LRR mayor (57% w/w, sistema 3). Este comportamiento puede deberse a la hidrofobicidad de cada fase (Simental-Martínez *et al.*, 2014). Un aumento en la LRR, conlleva a un aumento en la concentración de etanol y sal en la fase superior y la inferior, respectivamente. Eso hace que la composición de equilibrio sea significativamente diferente y además que las fases difieran más entre sí (Hatti-Kaul, 2000). El aumento de la concentración de etanol, aumenta la hidrofobicidad de la capa superior, favoreciendo la partición de los compuestos (Simental-Martínez *et al.*, 2014; Lucena de Souza *et al.* 2010). Un comportamiento similar se vio en la recuperación de fucoxantina usando sistemas basados en etanol/fosfato de potasio. La fucoxantina es un carotenoide con características hidrofóbicas que tiene propiedades antioxidantes (Gómez-Loredo *et al.*, 2014).

Con respecto al sistema ATPS etanol/ K_2HPO_4 , los fenoles tienen preferencia por la capa inferior. Se observa la misma tendencia, aunque los valores no difieren significativamente. Cuando la longitud de la recta de reparto se hace mayor, la fase inferior es más hidrofílica, por lo que se favorece la migración hacia esa fase. Por lo tanto, el menor valor de K se obtiene con la mayor LRR (57% w/w, sistema 12). Con el Sistema etanol- KH_2PO_4/K_2HPO_4 ATPS no se encontró una diferencia significativa entre los valores. El menor valor de K se obtuvo con el menor valor de LRR.

4.1.2.4 Influencia de la relación de volumen en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

Para estudiar la influencia de V_r en la partición de los compuestos fenólicos, se seleccionaron diferentes valores del mismo, manteniendo la LRR constante (Tabla 3.2; Fig 4.7). Las extracciones se realizaron a 25°C por 90 min, con una relación S/L de 1:10 y un tiempo de sedimentación de 1 h.

En la Fig. 4.7 se muestran las eficiencias de extracción de compuestos fenólicos en los sistemas ATPS basados en etanol y diferentes sales inorgánicas.

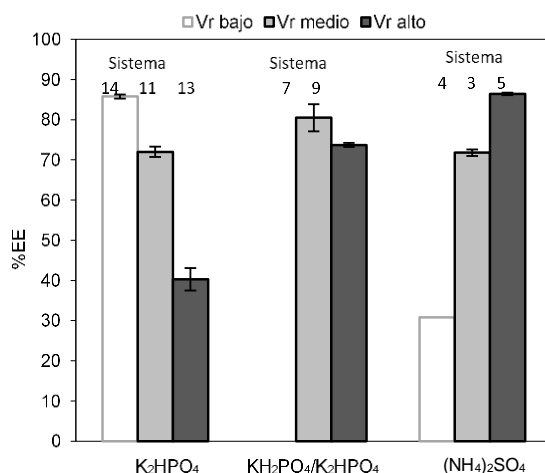


Fig 4.7. Eficiencia de extracción de fenoles, %EE, en los distintos ATPS basados en etanol/sal en función de la relación de volúmenes V_r (temperatura de extracción, 25°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h; S/L, 1:10).

Para el sistema ATPS formado por etanol-(NH₄)₂SO₄, se observa que al aumentar la relación de volúmenes la eficiencia aumenta. Al aumentar V_r , se obtiene un mayor volumen en la capa superior, por lo que los fenoles tienen mayor volumen disponible para migrar.

Se analizan los resultados para los sistemas ATPS compuestos por sales de fosfato (etanol/K₂HPO₄ y etanol/KH₂PO₄/K₂HPO₄) la eficiencia de extracción aumenta para menores valores de V_r . Esto implica que los fenoles también tienen mayor volumen disponible, dado que menor V_r conlleva a un mayor volumen de la fase inferior, que es, en definitiva, la fase donde, en estos casos, migran los compuestos. Esto puede deberse a que volúmenes muy chicos, pueden generar problemas de saturación (Benavides & Rito-Palomares, 2008; Gómez-Loredo *et al.*, 2014). Dado los resultados, para estudiar la influencia en la recuperación de compuestos fenólicos con la temperatura se seleccionaron los sistemas 5, 7 y 11.

4.1.2.5 Influencia de la temperatura en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

En la Tabla 4.8 se muestran los resultados de extracción de compuestos fenólicos en función de la temperatura (25, 45 y 65°C). Se observa que en todos los sistemas ATPS estudiados, el rendimiento de extracción aumenta con la temperatura. El sistema etanol/(NH₄)₂SO₄ a 65°C es el que da el mayor rendimiento de extracción 5,36 g EAG /100 g madera b.s. Sin embargo la partición de los fenoles muestra una tendencia diferente (Tabla 4.8), pues para todos los sistemas estudiados, la selectividad disminuye con la temperatura. La constante de reparto disminuye para el sistema etanol/(NH₄)₂SO₄ y aumenta para el sistema formado por etanol/sales de fosfato. Esta tendencia también se vio con los sistemas formados con PEG 2000 y diferentes sales inorgánicas.

En la bibliografía no se encontraron los datos de equilibrio de los sistemas estudiados a 45°C y 65°C. Igualmente, muchas investigaciones sugieren que las curvas binodales de los sistemas formados por alcohol y sales no son afectadas ni en la forma ni en la ubicación de las mismas con la temperatura (Katayama *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010),

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

como en el caso de los sistemas formados por polímeros+sales y polímeros+líquidos iónicos (Zafarani-Moattar & Hamzehzadeh, 2009; Voros *et al.*, 1993). El comportamiento observado puede deberse, por tanto, a que la solubilidad y la difusión de las moléculas aumenta con la temperatura (Jokić *et al.*, 2010)

Tabla 4.8

Rendimiento total de fenoles y constante de reparto en función de la temperatura (tiempo de sedimentación, 1 h; S/L, 1:10; tiempo de extracción, 90 min)

| Etanol-(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sistema 5) | | | | |
|--|--|--|-----------|----------------|
| Temperatura (°C) | TPY _{TP} (mg EAG /100 mg madera b.s) | TPY _{BP} (mg EAG /100 mg madera b.s) | K | V _r |
| 25 | 2,62 ^a ±0,10 | 0,41 ^a ±0,01 | 2,31±0,11 | 2,8 |
| 45 | 3,83 ^b ±0,08 | 0,57 ^b ±0,04 | 1,79±0,13 | 2,7 |
| 65 | 5,36 ^c ±0,05 | 0,63 ^c ±0,04 | 1,39±0,08 | 2,6 |
| Etanol- KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (Sistema 7) | | | | |
| 25 | 0,20 ^a ±0,01 | 0,60 ^a ±0,05 | 0,20±0,01 | 1,1 |
| 45 | 0,30 ^b ±0,01 | 0,73 ^b ±0,01 | 0,32±0,01 | 1,1 |
| 65 | 0,25 ^c ±0,01 | 0,66 ^{ab} ±0,06 | 0,34±0,01 | 1,2 |
| Etanol- K ₂ HPO ₄ (Sistema 14) | | | | |
| 25 | 0,07 ^a ±0,01 | 0,40 ^a ±0,05 | 0,57±0,02 | 0,3 |
| 45 | 0,10 ^b ±0,01 | 0,58 ^b ±0,01 | 0,75±0,03 | 0,2 |
| 65 | 0,10 ^{ab} ±0,02 | 0,95 ^c ±0,04 | 0,90±0,06 | 0,1 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). TPY: Rendimiento total de fenoles; TP: Fase superior; BP: Fase inferior; K: constante de reparto; V_r: relación de volúmenes

Como se mencionó anteriormente, el mayor rendimiento de fenoles se obtuvo a 65°C. A estos extractos a 65°C, se les midió la capacidad antioxidante FRAP, donde se observó que el mejor resultado se obtuvo también con el etanol/ (NH₄)₂SO₄ (Sistema 5) (20 mmol AAE /100 mg madera b.s) (Fig. 4.8). De lo anterior se desprende que ese ATPS es la mejor alternativa para recuperar compuestos fenólicos de residuos de eucalipto, ya que con él se obtuvieron los mejores rendimientos de extracción y la mayor actividad antioxidante FRAP.

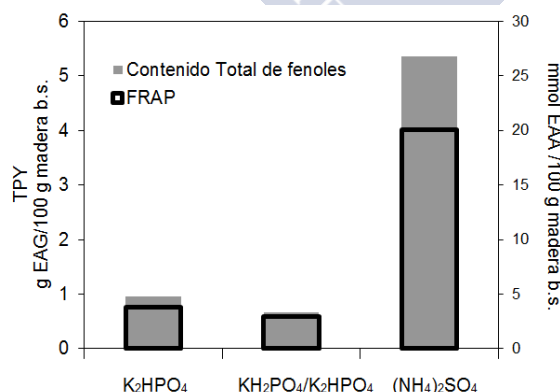


Fig 4.8. TPY, Rendimiento total de fenoles y capacidad antioxidante FRAP bajo las siguientes condiciones (temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h; S/L, 1:10). Sistema 5 (etanol/(NH₄)₂SO₄). Ver Tabla 3.2 para la composición del sistema, V_r y LRR.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos con los obtenidos con extracciones convencionales (etanol o etanol-agua) para el mismo material se observó que el

contenido total de fenoles fue mayor para los sistemas ATPS, mientras que la capacidad antioxidante FRAP fue ligeramente menor pero del mismo orden (rendimiento total de fenoles: 2,46-4,74 g EAG /100 g madera b.s.; capacidad antioxidante FRAP: 22,35-40,91 mmol EAA/100 mg madera b.s., respectivamente) (Fernández-Agulló *et al.*, 2015).

4.1.2.6 Caracterización de los extractos por espectroscopia de masas HPLC-ESI-TOF

Este análisis se realizó con el extracto con mayor rendimiento total de fenoles y mayor actividad antioxidante FRAP (Sistema 5 basado en etanol/(NH₄)₂SO₄ a 65°C). Se muestra el cromatograma correspondiente en la Figura 4.9.

En la Tabla 4.9 se presentan los compuestos identificados por comparación con los correspondientes patrones y/o peso molecular: miricetina 3-O-ramnósido (Pico 3), quercetina 3-glucósido, (Pico 3) quercetina 3- glucurónido (Pico 4) y ácido elágico (Pico 5) (Tabla 4.9, Figura 4.9). Como se muestra en la Fig. 4.9 de nuevo presenta compuestos con actividad antioxidante demostrada, siendo el ácido elágico el principal

Tabla 4.9

Compuestos fenólicos identificados en extractos de madera de eucalipto en la fase superior para el sistema basado en etanol/(NH₄)₂SO₄ (Sistema 5) en las siguientes condiciones (S/L, 1:10; temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h)

| Compuesto | [M-H] ⁻ (m/z) | Tiempo de retención (min) |
|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Ácido elágico | 301 ^a | 26,4 ^a |
| Quercetina 3- glucurónido | 477 ^b | 26,0 ^b |
| Miricetina 3-O-ramnósido | 463 ^b | 19,1 ^b |
| Quercetina 3-glucósido | 463 ^b | 19,1 ^b |

a, según patrón; b, basados en el peso molecular

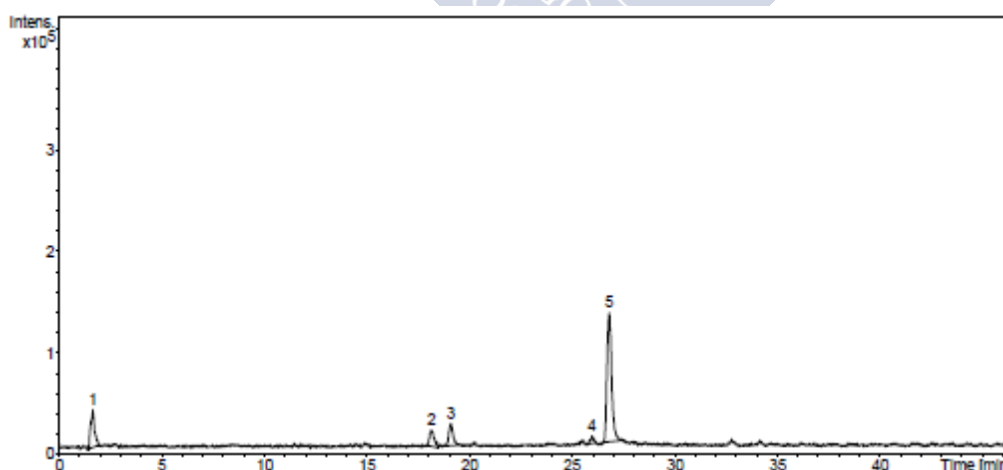


Fig 4.9. Cromatograma HPLC de los extractos de eucalipto en la fase superior bajo las siguientes condiciones: S/L, 1:10; temperatura de extracción, 65°C; tiempo de extracción, 90 min; tiempo de sedimentación, 1 h; Sistema 5 (etanol/(NH₄)₂SO₄) Picos identificados: (3) miricetina 3-O-ramnósido y quercetina 3-glucósido (4) quercetina 3- glucurónido y (5) ácido elágico

4.2 Extracción de compuestos fenólicos a partir de aserrín eucalipto

En el apartado 4.1 se observó que el disolvente de extracción y la sal utilizada juegan un rol muy importante en la extracción de compuestos fenólicos de restos de cizallado de tablero de eucalipto, y que, en general, se obtuvieron mayores rendimientos de fenoles con el sistema etanol-sulfato de amonio y PEG-sulfato de amonio que tenían un pH ácido (Benavides & Rito-Palomares, 2008; Simental-Martínez *et al.*, 2014). Por lo tanto, para realizar el estudio con aserrín de eucalipto se seleccionaron los sistemas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se evaluó la recuperación de compuestos fenólicos mediante dos tipos de ATPS: los basados en PEG, agua y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y los basados en etanol, agua y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4.2.1 Estudio de la extracción con ATPS basados en PEG+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

4.2.1.1 Influencia de la longitud de la recta de reparto y el peso molecular del PEG en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

Para estudiar la influencia de la longitud de la línea de reparto y el peso molecular del polímero, se seleccionaron tres polímeros con diferente peso molecular (1000, 2000 y 4000) y diferentes longitudes de la línea de reparto, manteniendo $V_r = 1$ (Tabla 3.3, Sistemas 1-8).

En esta instancia se realizaron extracciones para estudiar la influencia de la recta de reparto y el peso molecular del polímero. Se seleccionaron tres polímeros con diferente peso molecular (1000, 2000 y 4000). Para cada polímero se trabajó con diferentes LRR a una V_r constante e igual a 1 (Tabla 3.3, Sistemas 1-8). Las extracciones fueron realizadas a 25°C por 90 min, con una relación S/L de 1:10.

El aumento de la LRR generó un aumento en la afinidad de los compuestos fenólicos por la capa superior para los sistemas compuestos por PEG 1000 y PEG 2000 (Fig. 4.10, Tabla 4.10). Por otro lado, en los sistemas compuestos por PEG 4000 no se observó ningún cambio significativo al aumentar la LRR.

Al aumentar la LRR también lo hacen el volumen excluido y la hidrofobicidad del sistema debido a que la concentración del polímero en la fase superior es mayor. Esto puede deberse a que si bien la hidrofobicidad aumenta, a medida que el peso molecular del polímero aumenta, el volumen libre para que migren las moléculas disminuye (Simental-Martínez *et al.*, 2014).

La Fig. 4.10 indica que el valor más grande de K (66,6) se obtuvo con la mayor recta de reparto (Sistema 1) utilizando el polímero de menor peso molecular (PEG 1000). Para el mismo sistema se obtuvo, a su vez, el mayor contenido de fenoles en la fase superior 0,7 mg EAG/100 mg madera b.s. (Tabla 4.10).

En los resultados presentados en la Tabla 4.11, se muestra la influencia en la LLR en la capacidad antioxidante FRAP en los ATPS basados en PEG 1000+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e indican que, la mayor actividad antioxidante FRAP se obtiene también en la capa superior y que no varía significativamente al aumentar la hidrofobicidad del sistema.

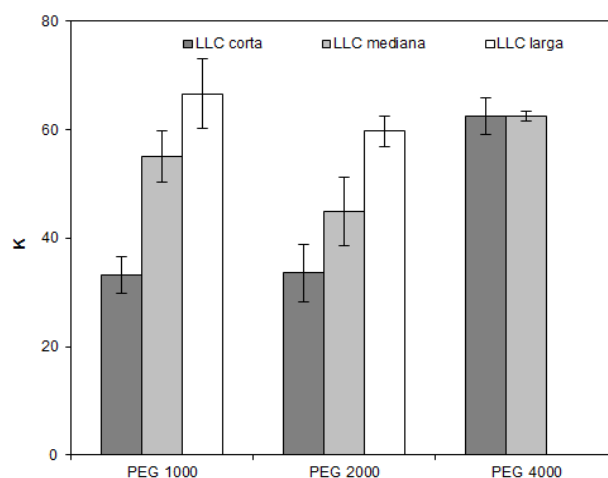


Fig 4.10. Coeficiente de reparto, K, en los distintos ATPS basados en PEG/(NH₄)₂SO₄ en función de la longitud de la recta de reparto (LRR) y peso molecular del polímero (MW) (temperatura de extracción: 25°C; tiempo de sedimentación: 1 h, S/L 1:10)

4.2.2 Estudio de la extracción con ATPS basados en etanol+(NH₄)₂SO₄

4.2.2.1 Influencia de la longitud de la recta de reparto en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

Como ya se mencionó previamente (4.1.2.3) la longitud de la recta de reparto tiene una influencia en la eficiencia del proceso de extracción (Hatti-Kaul, 2000). En esta instancia se seleccionaron tres longitudes de recta de reparto (LRR) para el sistema Etanol+(NH₄)₂SO₄, con una relación de volumen (V_r) alrededor de 1 (Tabla 3.4). Las condiciones de extracción fueron las siguientes: 25°C, tiempo de sedimentación, 1 h; relación S/L, 1:10; tiempo de extracción 90 min.

Tabla 4.10

Influencia de la LRR en la partición de fenoles en los ATPS basados en PEG1000+(NH₄)₂SO₄. (tiempo de sedimentación, 1 h; temperatura de extracción, 25°C; S/L, 1:10; tiempo de extracción, 90 min)

| Sistema | PEG MW | LRR | TPY _{TP} mg EAG /100 mg madera b.s. | TPY _{BP} mg EAG /100 mg madera b.s. |
|---------|--------|------|--|--|
| 1 | 1000 | 31,9 | 0,59 ^a ±0,02 | 0,02 ^a ±0,00 |
| 2 | | 38,3 | 0,65 ^b ±0,01 | 0,01 ^{ab} ±0,00 |
| 3 | | 45,2 | 0,70 ^b ±0,01 | 0,01 ^b ±0,00 |
| 4 | 2000 | 31,4 | 0,40 ^a ±0,01 | 0,01 ^a ±0,00 |
| 5 | | 39,7 | 0,53 ^b ±0,04 | 0,01 ^a ±0,00 |
| 6 | | 45,4 | 0,67 ^c ±0,05 | 0,01 ^a ±0,00 |
| 7 | 4000 | 33,3 | 0,52 ^a ±0,05 | 0,01 ^a ±0,01 |
| 8 | | 38,8 | 0,57 ^a ±0,03 | 0,01 ^a ±0,00 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). TPY: Rendimiento total de fenoles; TP: Fase superior; BP: Fase inferior

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.11

Influencia de la LRR en la capacidad antioxidante FRAP en los ATPS basados en PEG 1000+(NH₄)₂SO₄ . (tiempo de sedimentación, 1 h; temperatura de extracción, 25°C; S/L, 1:10; tiempo de extracción, 90 min)

| Sistema | PEG MW | LRR | FRAP (mmol of EAA/100 mg madera b.s.) Fase superior | FRAP (mmol of EAA/100 mg madera b.s.) Fase inferior |
|---------|--------|------|--|--|
| 1 | 1000 | 31,9 | 3233,2 ^a ±36,4 | 43,7 ^a ±4,3 |
| 2 | | 38,3 | 3942,8 ^a ±26,5 | 58,6 ^a ±1,0 |
| 3 | | 45,2 | 3259,0 ^a ±34,7 | 54,5 ^a ±2,8 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). LRR: longitud de recta de reparto

En la Tabla 4.12 se observa que el mayor contenido total de fenoles, la mayor K y la mayor eficiencia de extracción se obtiene con el sistema 3 (mayor LRR). Sin embargo, cabe destacar que no existe diferencia significativa entre los sistemas seleccionados. La misma tendencia se observó en las extracciones a partir de restos de cizallado de eucalipto (apartado 4.1.2.3) trabajando con los sistemas con etanol, aunque los resultados eran mayores (1,95±0,18 mg EAG /100 mg madera b.s.) que con el aserrín.

Tabla 4.12

Influencia de la longitud de la recta de reparto en la partición de fenoles en los ATPS basados en etanol+(NH₄)₂SO₄ (tiempo de sedimentación, 1 h; temperatura de extracción, 25°C ; S/L, 1:10; tiempo de extracción 90 min).

| Sistema | TPY _{TP} (mg EAG /100 mg madera b.s.) | TPY _{BP} (mg EAG /100 mg madera b.s.) | K | %EE (mg EAG fase superior/ mg extraídos) |
|---------|--|--|------------------------|---|
| 1 | 0,75 ^a ±0,09 | 0,101 ^{ab} ±0,008 | 9,7 ^a ±0,9 | 87,4±1,2 |
| 2 | 0,76 ^a ±0,07 | 0,119 ^a ±0,003 | 8,3 ^a ±0,6 | 86,3±1,1 |
| 3 | 0,79 ^a ±0,03 | 0,083 ^b ±0,016 | 12,1 ^a ±2,1 | 90,5±1,3 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). TPY: Rendimiento total de fenoles; TP: Fase superior; BP: Fase inferior

4.2.2.2 Influencia de la relación de volumen en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

Para estudiar la influencia de la composición en la alimentación se evaluó la relación de volúmenes (V_r) sobre la recuperación de compuestos fenólicos. Todas las extracciones se realizaron a 25°C, con una relación sólido/líquido de 1:10, tiempo de sedimentación 1 h y 90 min de tiempo de extracción. Se trabajó con una recta de reparto fija (56.7%(w/w)) y se cambió la composición de alimentación del sistema para variar la relación de volúmenes entre las capas (Tabla 3.4).

En la Figura 4.11 se presentan los resultados para la eficiencia de la extracción y el rendimiento total de fenoles. Se observa que la relación de volúmenes afecta al rendimiento de extracción, de forma similar a lo encontrado con los restos de cizallado de tablero (apartado 4.1.2.4). Así, una mayor relación de volúmenes aumenta la cantidad de fenoles extraídos en la capa superior, posiblemente debido al del mayor

volumen disponible (Benavides & Rito-Palomares, 2008; Gómez-Loredo *et al.*, 2014). Se selecciona el sistema 4 (Tabla 3.4) para continuar con los experimentos.

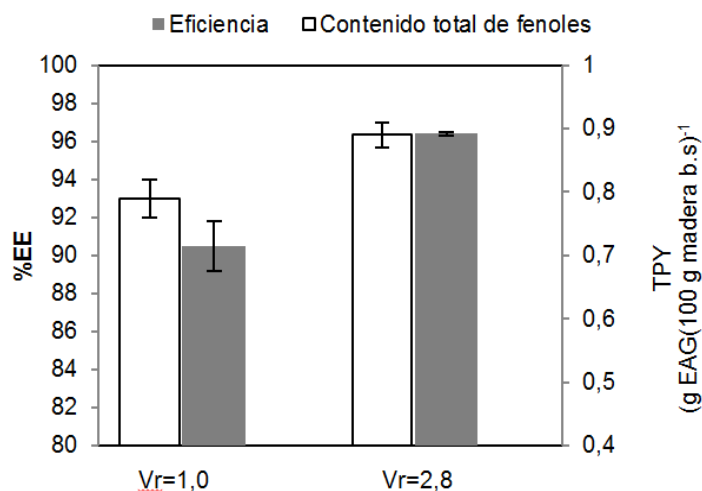


Fig. 4.11. Rendimiento total de fenoles y eficiencia de extracción basados en etanol+(NH₄)₂SO₄. Sistema 3 y 4. Ver Tabla 3.4 para la composición del sistema y LRR. (temperatura de extracción, 25°C, tiempo de sedimentación, 1 h; S/L, 1:10, tiempo de extracción 90 min).

4.2.2.3 Influencia de la relación sólido/líquido en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

Para evaluar la influencia de la relación sólido/líquido S/L se realizaron ensayos a 25°C con diferentes relaciones (0,25:10, 0,5:10 y 1:10), tal como se estudió en el apartado 4.1.1.6.

Los resultados se presentan en la Tabla 4.13 donde se observa hay cambio significativo entre 0,5:10 y los otros dos, aunque prácticamente el valor es el mismo. Por lo que se considera que es más adecuado trabajar con una relación 1:10. Primeramente se utiliza menor cantidad de disolvente y además al mantenerse la fase líquida más concentrada por un decremento en la cantidad de disolvente empleado, el coste del proceso de extracción será menor (Radojkovic *et al.*, 2012).

Tabla 4.13

Influencia de la relación sólido/líquido en la partición de fenoles en los ATPS basados en etanol+(NH₄)₂SO₄ (tiempo de sedimentación, 1 h; temperatura de extracción, 25°C; tiempo de extracción 90 min; Sistema 5)

| Relación (S/L) | TPY _{TP} (mg EAG /100 mg madera b.s.) | TPY _{BP} (mg EAG /100 mg madera b.s.) | % (mg EAG fase superior/ mg extraídos) |
|----------------|---|---|---|
| 0,25:10 | 0,84 ^a ±0,02 | 0,020 ^a ±0,001 | 97,7±1,0 |
| 0,5:10 | 0,91 ^b ±0,00 | 0,026 ^b ±0,001 | 97,3±0,7 |
| 1:10 | 0,89 ^{ab} ±0,02 | 0,034 ^c ±0,001 | 96,4±0,1 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). TPY: Rendimiento total de fenoles; TP: Fase superior; BP: Fase inferior

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.2.4 Influencia de la temperatura en la recuperación de compuestos fenólicos y su partición

Para estudiar la influencia de la temperatura de extracción sobre el rendimiento de extracción se realizaron experimentos modificando la temperatura (25, 45 y 65°C) y los resultados obtenidos para el contenido en fenoles y la actividad antioxidante FRAP se muestran en la Tabla 4.14.

Como ya se mencionó previamente (apartado 4.1.2.5), se han observado mejores rendimientos de extracción al incrementar la temperatura y la constante de reparto tiende a disminuir, lo cual se explica en parte por el aumento de la solubilidad del soluto y en parte por el aumento en la difusividad efectiva en el interior del sólido al aumentar la temperatura (Jokić *et al.*, 2010).

Sin embargo la temperatura es una variable del proceso que debe mantenerse por debajo de cierto valor, ya que temperaturas elevadas pueden afectar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos debido a reacciones de degradación química y enzimática o producir pérdidas por volatilización o descomposición térmica. Por lo tanto, en este caso, para tener en cuenta tanto no sólo la eficiencia de la extracción sino también la actividad antioxidante de los compuestos activos, se evaluó la capacidad antioxidante mediante el método FRAP a 25 y a 65°C.

Se vio que para las condiciones ensayadas, las condiciones óptimas para maximizar el rendimiento de extracción y la actividad antioxidante FRAP corresponden a una temperatura de 65°C (máxima temperatura ensayada).

Tabla 4.14

Influencia de la temperatura en la partición de fenoles y la capacidad antioxidante FRAP en los ATPS basados en etanol+(NH₄)₂SO₄. (tiempo de sedimentación, 1 h; S/L 1:10; tiempo de extracción 90 min; Sistema 5)

| Temperatura (°C) | TPY _{TP} (mg EAG /100 mg madera b.s.) | TPY _{BP} (mg EAG /100 mg madera b.s.) | K | FRAP _{TP} mmol EAA/100 mg madera b.s. |
|------------------|---|---|------------------------|---|
| 25 | 0,89 ^a ±0,02 | 0,034 ^a ±0,001 | 11,5 ^a ±0,5 | 3605 ^a ±199 |
| 45 | 1,09 ^a ±0,12 | 0,045 ^b ±0,003 | 8,4 ^b ±0,0 | - |
| 65 | 1,30 ^b ±0,09 | 0,047 ^b ±0,005 | 9,8 ^b ±1,3 | 14486 ^b ±299 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). TPY: Rendimiento total de fenoles; TP: Fase superior; BP: Fase inferior; K: constante de reparto

4.3 Extracción de compuestos fenólicos a partir de paja de trigo

4.3.1 Estudio de la extracción con ATPS basados en Tween 20+dihidrógeno citrato de colina (ChDHC)

4.3.1.1 Determinación de los datos de equilibrio

Con el objetivo de evaluar la capacidad de formar ATPS basados en Tween 20 y ChDHC, se determinaron los diagramas de fase a 20, 40, 50 y 60°C. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.15 y en las Figuras 4.12 y 4.13.

La Fig 4.12 y la Tabla 4.15 muestra los datos de equilibrio del sistema ternario Tween 20+ ChDHC + Agua. La Figura 4.13 muestra los datos de equilibrio de la curva binodal.

Se observa en la Figura 4.12 que por encima de la curva binodal está la región de fase líquida, por debajo se encuentra la región trifásica, donde el ChDHC coexiste con dos fases líquidas (S+2L) y entre ambas encuentra la zona bifásica (L+L), como consecuencia se observa que el surfactante Tween 20 y el líquido iónico ChDHC son capaces de formar los sistemas ATPS.

La tendencia que se observa es que la región de inmiscibilidad del ATPS aumenta con el aumento de la temperatura, debido a que las interacciones de los enlaces de hidrógeno entre el agua y la parte hidrofílica del surfactante no iónico se debilita. Por lo tanto el agua es excluida de la fase rica en surfactante, como consecuencia aumenta el carácter hidrofóbico de la fase superior (Alvarez *et al.*, 2015).

Los datos experimentales de las curvas binodales fueron ajustados con varios modelos empíricos según las ecuaciones 4.1, 4.2 y 4.3, que han sido también utilizados para ATPS similares (Wang *et al.*, 2010; Murugesan & Perumalsamy, 2005; Torres-Plasencia *et al.*, 2015)

$$w_1 = \exp(a + bw_2^{0.5} + cw_2 + dw_2^2) \quad \text{Ecuación 4.1}$$

$$w_1 = e + fw_2^{0.5} + gw_2 \quad \text{Ecuación 4.2}$$

$$w_1 = h\ln(w_2 + i) + j \quad \text{Ecuación 4.3}$$

donde w_1 es la fracción másica de Tween 20, w_2 es la fracción másica de ChDHC y a, b, c, d, e, f, g, h, i, j son los parámetros de ajuste del modelo que minimizan la desviación estándar (σ) (Ecuación 4.4).

$$\sigma = \left(\frac{\sum_i^{n_{DAT}} (w_{exp} - w_{adjust})^2}{n_{DAT}} \right)^{0.5} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

donde w_{exp} , w_{adjust} representan los valores experimentales y teóricos, respectivamente, y n_{DAT} es el número de datos experimentales.

Los parámetros de ajuste y la desviación estándar, realizados en solver Excel 2010 se muestran en las Tablas 4.16-4.18.

Como se observa en las Tablas 4.16-4.18, los mejores resultados del ajuste se encuentran para el primer modelo (Ecuación 4.1) con valores más bajos de la desviación estándar. Se han encontrado resultados similares para otros ATPS basados en líquidos iónicos (Álvarez *et al.*, 2015). En la Figura 4.13 se muestra con líneas sólidas el ajuste del modelo 4.1 a las diferentes temperaturas ensayadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las LRR y su pendiente (S) son calculadas de la siguiente manera:

$$LRR = \left[(w_1^t - w_1^b)^2 - (w_2^t - w_2^b)^2 \right]^{0.5} \quad \text{Ecuación 4.5}$$

$$S = \frac{(w_1^t - w_1^b)}{(w_2^t - w_2^b)} \quad \text{Ecuación 4.6}$$

donde w_1 y w_2 representan la fracción másica del surfactante y sal respectivamente; t y b representan la fase superior e inferior, respectivamente. La composición de las fases en equilibrio en la región bifásica, la LRR y la pendiente (S) se muestran en la Tabla 4.19 y están representados en la Fig. 4.14.

Tabla 4.15. Datos de equilibrio para el Sistema ternario: Tween 20 (1) + ChDHC (2) + H₂O (3) desde 20 a 60°C

| 20°C | | 40°C | | 50°C | | 60°C | |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 100 w_2 | 100 w_1 | 100 w_2 | 100 w_1 | 100 w_2 | 100 w_1 | 100 w_2 | 100 w_1 |
| Equilibrio (Líquido-Líquido) | | | | | | | |
| 1,91 | 81,65 | 8,31 | 72,16 | 8,18 | 73,29 | 7,14 | 65,28 |
| 8,41 | 70,87 | 14,98 | 59,55 | 13,92 | 58,98 | 12,00 | 55,00 |
| 13,51 | 57,76 | 22,73 | 42,47 | 19,12 | 49,24 | 20,26 | 44,36 |
| 21,27 | 51,31 | 25,76 | 39,81 | 24,49 | 38,91 | 24,37 | 33,59 |
| 26,62 | 40,52 | 27,60 | 37,73 | 27,00 | 33,00 | 26,89 | 28,27 |
| 31,74 | 33,36 | 30,00 | 30,00 | 29,00 | 27,00 | 31,57 | 20,73 |
| 36,00 | 27,00 | 39,24 | 17,76 | 32,87 | 21,03 | 35,24 | 14,85 |
| 41,83 | 19,76 | 43,84 | 11,32 | 38,64 | 10,54 | 36,56 | 9,88 |
| 46,67 | 13,44 | 44,45 | 9,44 | 42,73 | 4,95 | 37,03 | 4,64 |
| 49,84 | 8,49 | 53,03 | 1,37 | 43,62 | 0,88 | 40,88 | 0,84 |
| 50,99 | 1,14 | 55,20 | 0,30 | 55,97 | 0,52 | 67,81 | 1,77 |
| 58,19 | 1,88 | 61,76 | 0,66 | 57,23 | 1,49 | 64,84 | 1,69 |
| 63,66 | 0,92 | 64,49 | 0,73 | 64,08 | 0,96 | 59,75 | 1,41 |
| 66,24 | 0,77 | 67,31 | 0,42 | 66,73 | 1,05 | 59,76 | 1,54 |
| 66,33 | 1,46 | 74,22 | 1,91 | | | | |
| Equilibrio (Sólido-Líquido) | | | | | | | |
| 1,91 | 91,00 | 1,61 | 91,83 | 9,24 | 82,82 | 1,90 | 89,05 |
| 10,01 | 84,38 | 9,88 | 85,76 | 18,18 | 77,00 | 9,17 | 83,90 |
| 17,69 | 75,55 | 18,35 | 72,96 | 27,39 | 60,52 | 17,93 | 70,94 |
| 26,32 | 63,47 | 27,69 | 61,00 | 35,06 | 55,86 | 29,31 | 64,19 |
| 34,85 | 54,04 | 33,68 | 52,06 | 40,05 | 46,35 | 36,28 | 50,01 |
| 40,62 | 44,89 | 38,81 | 42,47 | 52,81 | 35,56 | 40,80 | 42,89 |
| 51,69 | 35,53 | 48,20 | 35,54 | 54,57 | 24,91 | 51,18 | 33,60 |
| 57,61 | 25,73 | 56,53 | 25,58 | 64,61 | 18,44 | 58,22 | 24,53 |
| 63,31 | 18,23 | 63,29 | 16,35 | 72,96 | 8,46 | 63,63 | 17,20 |
| 66,18 | 11,27 | 66,11 | 14,04 | 78,18 | 1,58 | 72,08 | 9,03 |
| 76,91 | 1,71 | | | | | 80,15 | 1,64 |

Como se puede observar en la Figura 4.14, la fase superior es la rica en surfactante mientras que la inferior es la rica en sal. La fracción másica del surfactante en la fase inferior es baja (entre 0 y 1.57%). En el caso de la fase superior, la fracción másica del surfactante es superior al 70%.

El análisis de los datos de equilibrio revelan que mayores concentraciones de ChDHC en la fase inferior se correlacionan con mayores concentraciones de Tween 20 en la fase superior, esto significa que mayor cantidad de moléculas del líquido iónico generan mayor competencia con las moléculas del agua, por lo tanto, mayor concentración del surfactante en la fase superior.

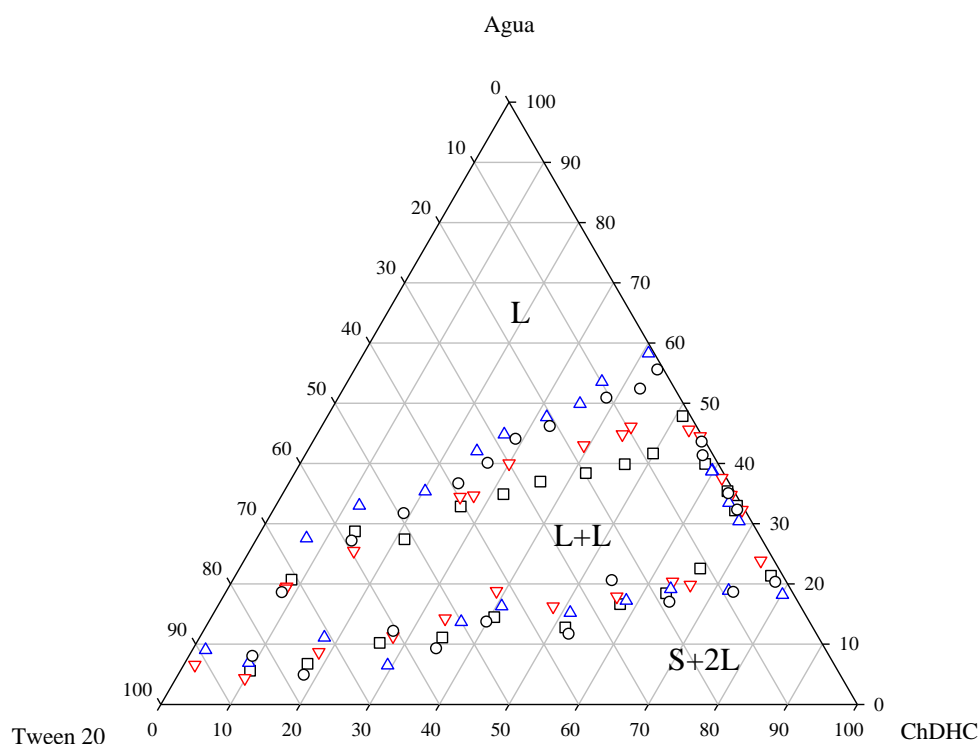


Fig 4.12. Diagrama de fases para el sistema Tween 20 (1)+ ChDHC (2)+ H₂O (3) a T = 20°C (□), 40°C (▽), 50°C (○) y 60°C (Δ) a P=101.3 KPa.

Tabla 4.16. Parámetros de ajuste y la desviación estándar de la ecuación 4.1 del sistema ternario Tween 20 (1) + ChDHC (2) +H₂O (3) desde 20 a 60°C

| T(°C) | a | b | c | d | σ |
|--|---------|----------|----------|-----------|--------|
| Tween 20 (1) + ChDHC (2) +H ₂ O (3) | | | | | |
| 20 | -2,3348 | -6,1113 | 19,7521 | -121,8163 | 0,0020 |
| 40 | -1,2431 | -16,5272 | 47,5330 | -191,9186 | 0,0012 |
| 50 | 0,4029 | -36,4216 | 113,9536 | -409,9534 | 0,0010 |
| 60 | 0,0057 | -35,6312 | 118,6849 | -457,5141 | 0,0015 |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.17. Parámetros de ajuste y la desviación estándar de la ecuación 4.2 del sistema ternario Tween 20 (1) + ChDHC (2) +H₂O (3) desde 20 a 60°C

| T(°C) | e | f | g | σ |
|--|--------|---------|---------|----------|
| Tween 20 (1) + ChDHC (2) +H ₂ O (3) | | | | |
| 20 | 0,0812 | -0,1435 | -0,0726 | 0,0033 |
| 40 | 0,1164 | -0,3646 | 0,2392 | 0,0026 |
| 50 | 0,1374 | -0,5199 | 0,4757 | 0,0034 |
| 60 | 0,1178 | -0,4525 | 0,4275 | 0,0040 |

Tabla 4.18. Parámetros de ajuste y la desviación estándar de la ecuación 4.3 del sistema ternario Tween 20 (1) + ChDHC (2) +H₂O (3) desde 20 a 60°C

| T(°C) | h | i | j | σ |
|--|---------|--------|--------|----------|
| Tween 20 (1) + ChDHC (2) +H ₂ O (3) | | | | |
| 20 | -2,5650 | 8,2638 | 5,4798 | 0,0046 |
| 40 | -2,4907 | 8,2937 | 5,3281 | 0,0051 |
| 50 | -2,4755 | 8,3220 | 5,3014 | 0,0074 |
| 60 | -2,0507 | 8,3199 | 4,3922 | 0,0077 |

Cuando se trabaja a temperaturas de 40, 50 y 60°C, al disminuir la LRR, se obtiene una *S* mayor. Por otro lado, al trabajar a 20°C, bajando la LRR no se observa una diferencia apreciable en las pendientes de las rectas. Además, se obtienen mayores valores de LRR cuando el contenido del ChDHC aumenta (Tabla 4.19).

4.3.1.2 Partición de ácidos fenólicos

En esta etapa de la investigación, con los sistemas ATPS formados por Tween 20 y ChDHC se realizaron extracciones de hidrolizados de paja de trigo a diferentes composiciones de alimentación (Tabla 3.5) para obtener ácidos fenólicos con actividad antioxidante.

El primer objetivo fue cuantificar e identificar los ácidos fenólicos y la actividad antioxidante del hidrolizado de la paja de trigo (HBN). Los resultados se muestran en la Figura 4.5 y Tabla 4.20.

En la Fig. 4.15 se muestra el cromatograma obtenido mediante HPLC del HBN, que indica la presencia clara de dos picos: ácido *p*-cumárico (CA) (Pico 1) y ácido ferúlico (FA) (Pico 2) siendo la concentración de CA de 0,176 mg CA/g WS b.s. y la de FA de 0,091 mg FA/g WS b.s.

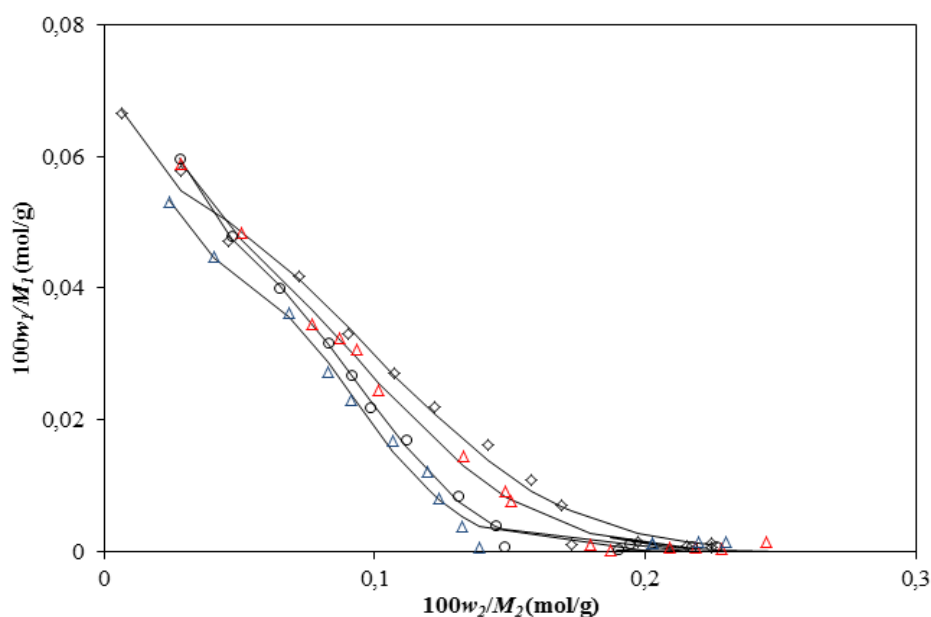


Fig 4.13. Curvas de solubilidad experimental y su correlación del sistema formado por Tween 20 (1)+ ChDHC (2)+ H₂O (3) a T = 20°C (□), 40°C (Δ), 50°C (○), 60°C (Δ) y P=101,3 kPa. Los símbolos representan los valores experimentales y las líneas sólidas los parámetros obtenidos con la ecuación 4.1.

Tabla 4.19. Composición de las recta de reparto para el sistema ternario Tween 20 (1) + ChDHC (2) + H₂O (3) desde 20 a 60°C

| T(°C) | Composición de alimentación | | Fase superior | | Fase inferior | | LRR | S |
|--|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------|-------|
| | 100 w ₂ | 100 w ₁ | 100 w ₂ | 100 w ₁ | 100 w ₂ | 100 w ₁ | | |
| Tween 20 (1) + ChDHC (2) +H ₂ O (3) | | | | | | | | |
| 20 | 53,62 | 24,05 | 7,01 | 84,61 | 71,06 | 1,10E-03 | 106,12 | -1,32 |
| 20 | 46,95 | 21,41 | 8,08 | 72,55 | 62,54 | 0 | 90,72 | -1,33 |
| 40 | 54,03 | 22,49 | 1,57 | 91,04 | 71,29 | 0,15 | 114,55 | -1,30 |
| 40 | 45,28 | 21,47 | 6,56 | 76,52 | 59,63 | 0,16 | 93,00 | -1,44 |
| 50 | 53,76 | 25,20 | 8,67 | 83,71 | 71,99 | 1,02 | 104,15 | -1,31 |
| 50 | 42,94 | 22,98 | 9,19 | 72,41 | 58,00 | 0,097 | 87,24 | -1,48 |
| 60 | 51,93 | 20,63 | 2,48 | 87,68 | 65,68 | 0,91 | 107,35 | -1,36 |
| 60 | 42,14 | 17,02 | 3,55 | 79,04 | 50,67 | 1,57 | 90,67 | -1,64 |

Además el rendimiento total de fenoles fue de 4,616 mg GAE/g WS b.s.; la actividad antioxidante DPPH 0,757 μ mol TRE/g WS b.s. y finalmente la actividad antioxidante ABTS fue de 7,551 μ mol TRE/g WS b.s. La cantidad de CA y FA representan el 5,78% del total de fenoles. Aunque es difícil comparar los resultados con otros trabajos de la bibliografía debido a diferencias en cultivos, pretratamientos, residuos, etc, los resultados son similares a los obtenidos con otros trabajos. Akpinar & Usal, 2015 publicaron que realizando una hidrólisis alcalina de la paja de trigo de Turquía, el porcentaje de CA y FA era de 9,8% respecto al TPY; Max *et al.*, 2010

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

reportó que realizando también una hidrólisis alcalina de los recortes de los brotes de vino, el porcentaje era de 2,77%; Moreira *et al.*, 2013 reportó que luego de realizar extracciones alcalinas a partir de cereales gastados de cerveza el porcentaje obtenido era del 9,8%.

Como los diagramas de fases fueron caracterizados con un modelo acuoso de Tween 20 y ChDHC, antes de realizar la extracción del hidrolizado HBN se procedió a formar un nuevo ATPS con los componentes Tween 20 y ChDHC sustituyendo el agua por HBN, ya que la incorporación de HBN podría suponer una modificación de las curvas binodales obtenidas anteriormente (apartado 4.3.1.1). En la Figura 4.16 se comparan las curvas de solubilidad obtenidas para los sistemas de Tween 20 + ChDHC + H₂O y Tween 20 + ChDHC + HBN a 20°C.

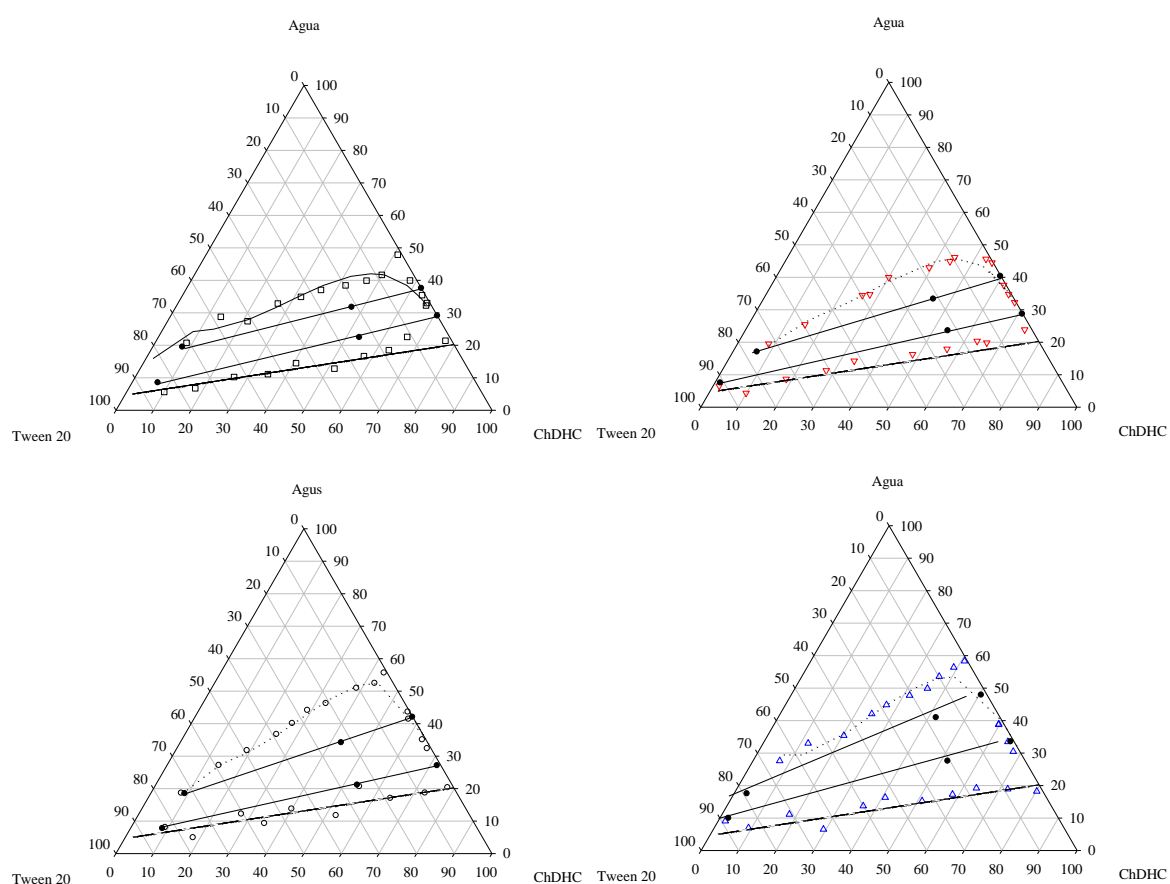


Fig. 4.14. Rectas de reparto (líneas sólidas) para el sistema Tween 20 (1)+ ChDHC (2)+ H₂O (3) a T = 20°C (□), T = 40°C (▽), T = 50°C (○) y T = 60°C (Δ). Los símbolos representan la curva binodal experimental. La línea discontinua es una guía para el ojo y la punteada representan el modelo 4.1.

Se demostró que la utilización del HBN no modifica las regiones de inmiscibilidad (Fig 4.16), por lo tanto, se pueden utilizar los datos obtenidos en las curvas binodales y las LRR para la selección de los ATPS a utilizar (Tabla 3.5).

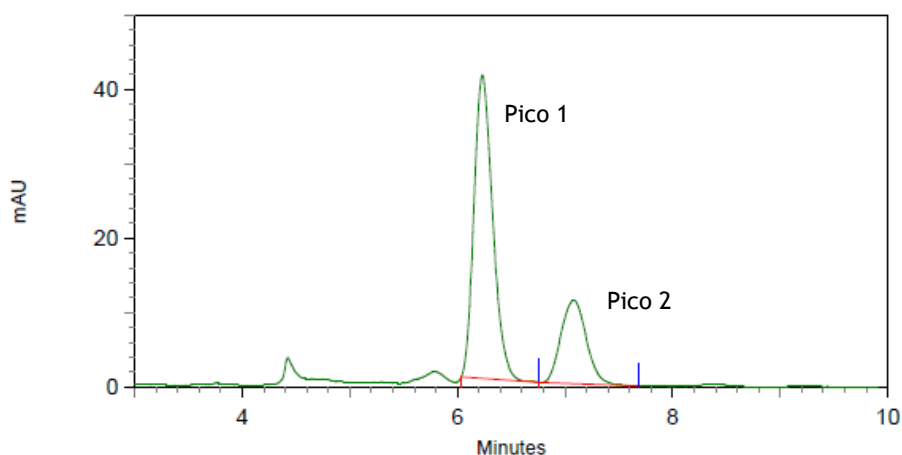


Fig.4.15. Cromatograma HPLC del HBN siendo (1) ácido *p*-cumárico, (2) ácido ferúlico.

Tabla 4.20. Composición en ácidos fenólicos, rendimiento total de fenoles (TPY), actividad antioxidante DPPH y ABTS en el hidrolizado neutralizado (HBN).

| Parámetros de bioactividad | |
|----------------------------|-------------|
| CA (mg CA/ g WS b.s) | 0,176±0,006 |
| FA (mg FA/ g WS b.s) | 0,091±0,002 |
| TPY (mg EAG/g WS b.s) | 4,617±0,020 |
| DPPH (μmol TRE/g WS b.s) | 0,757±0,014 |
| ABTS (μmol TRE/g WS b.s) | 7,551±0,840 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes ($p<0,05$). TPY: Rendimiento total de fenoles; CA: ácido *p*-cumárico; FA: ácido ferúlico.

Para analizar la influencia de temperatura en la extracción de compuestos fenólicos desde el HBN, los experimentos fueron realizados a diferentes temperaturas (20, 40, 50 y 60°C) (Sistema 3, Tabla 4.21).

El rendimiento total de fenoles y la eficiencia de extracción se presentan en la Tabla 4.21. Como se puede ver, el rendimiento total de fenoles en la fase superior no presenta una diferencia significativa a distintas temperaturas y los valores de la eficiencia son similares en consecuencia se considera más apropiado trabajar a 20°C. Las razones se exponen a continuación. El aumento de la temperatura puede conllevar a una disminución de K (apartado 4.1.1.2).

Además, altas temperaturas pueden afectar la estabilidad de los componentes fenólicos, puede conllevar a reacciones de degradación o pérdidas por volatilización, o descomposiciones térmicas. Esto puede disminuir la actividad de los antioxidantes obtenidos (Dai & Mumper, 2010). Por lo tanto, no es recomendable aumentar la temperatura por encima del óptimo, dado que aumenta además la economía del proceso, ya que involucra mayor gasto de energía.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

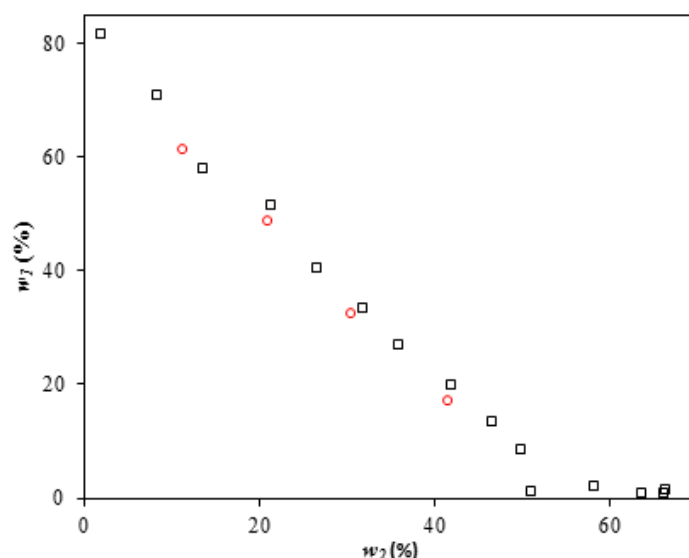


Fig 4.16. Curva de solubilidad experimental de Tween 20 (1) + ChDHC (2)+ H₂O (3) (□) y Tween 20 (1)+ ChDHC (2)+ HBN (4) (○) a T = 20°C.

Las extracciones del HBN se realizaron a diferentes composiciones ubicadas en la recta de reparto de mayor longitud (106%), operando a 20°C, tomando como base la posible reutilización de los componentes del ATPS (Tabla 3.5).

Se analizó la influencia de la composición en la alimentación en la partición de los ácidos fenólicos en esa recta de reparto. Este factor influye es importante debido a que el volumen final de las fases cambia. Se seleccionaron 3 composiciones de alimentación diferentes (Tabla 3.5) con distintas relaciones de volúmenes (V_r) y en todos los casos el pH se mantuvo alrededor de 4.

De acuerdo con las Tablas 4.22 y 4.23, se observa que el CA y el FA migran para la capa rica en Tween 20 ($K > 1$). En este caso, la capa hidrofóbica es la superior (rica en Tween) y la más hidrofílica es la inferior (rica en líquido iónico). La razón de este comportamiento puede explicarse debido a que el pH de operación crea dificultades de formación de enlaces de hidrógeno con agua, promoviendo el “salting out” de los ácidos fenólicos a la fase superior (Mota *et al.*, 2008).

Además, el coeficiente de partición del CA es mayor a uno y varía en un rango de 2,76-6,13; la eficiencia de extracción del CA 72-93% y finalmente la concentración de CA varía en el rango de 0,1291-0,1671 mg CA/ g WS b.s. Con respecto al FA, el coeficiente de partición varía en un rango de 2.34-4.18; la eficiencia de extracción del FA varía entre 69-90% y finalmente la concentración de FA varía en un rango de 0,0626-0,0818 mg FA/ g WS b.s. Como se observa, el coeficiente de partición del CA es mayor que el de FA. Esto se lo puede atribuir a la diferencia en hidrofobicidad de ambas moléculas, que se concluye a partir de los valores de log P (chemicalize.com). La más hidrofóbica es el ácido *p*-cumárico (log P=1,29) que presenta menor capacidad de enlaces de hidrógeno con las moléculas del agua que el ácido ferúlico (log P=0,78). Finalmente, si se comparan los valores obtenidos de DPPH y ABTS con los del HBN

(Tabla 4.20 y 4.24), se observa una ligera disminución en la actividad antioxidante DPPH, mientras que el ABTS se mantiene casi constante.

Tabla 4.21. Rendimiento total de fenoles y eficiencia de extracción de fenoles a diferentes temperaturas de extracción.

| Tween20- ChDHC (Sistema 3) | | |
|----------------------------|--|--|
| Temperatura (°C) | TPY _{TP} (mg EAG/g of WS b.s.) | %EE (mg EAG fase superior/ mg GAE en HBN) |
| 20 | 3,12 ^a ±0,04 | 67,5±0,8 |
| 40 | 3,33 ^a ±0,01 | 72,1±0,3 |
| 50 | 3,22 ^a ±0,01 | 69,7±0,4 |
| 60 | 3,27 ^a ±0,03 | 70,7±0,9 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). TPY: Rendimiento total de fenoles; TP: fase superior; %EE: Eficiencia de extracción de compuestos fenólicos.

Por otro lado, la mayor concentración de ácidos fenólicos y el mayor contenido de fenoles se obtuvieron con el sistema 2 que presenta el valor más alto de la relación V_r (Tablas 4.22-4.24). La razón puede ser debido al volumen adicional de la capa superior, que puede estar solucionando problemas de saturación y estar promoviendo la migración de las moléculas hacia esa capa (Gómez -Loredo *et al.* 2014).

En resumen, el sistema Tween20/ChDHC/HBN es capaz de promover la extracción de los ácidos fenólicos *p*-cumárico y ferúlico con valores altos de la actividad antioxidante.

Tabla 4.22. Influencia de la composición de la alimentación en la extracción y partición del ácido *p*-cumárico

| Sistema | Concentración de CA en la fase rica en tween (mg CA/ g WS b.s.) Fase superior | K (Coeficiente de Partición) | %EE (mg CA fase superior / mg CA en HBN)x100 |
|---------|---|---------------------------------|---|
| 1 | 0,1291 ^a ±0,0212 | 6,13±0,24 | 71,9±2,4 |
| 2 | 0,1671 ^b ±0,0243 | 2,76±0,29 | 93,0±1,0 |
| 3 | 0,1609 ^b ±0,00206 | 5,34±0,59 | 89,6±0,0 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). CA: ácido *p*-cumárico; K: Coeficiente de partición; %EE: Eficiencia de extracción de CA.

Tabla 4.23 Influencia de la composición de alimentación en la extracción y partición del ácido ferúlico

| Sistema | Concentración de FA en la fase rica en tween (mg FA/ g WS b.s.) Fase superior | K (Coeficiente de Partición) | %EE (mg FA fase superior/ mg FA en HBN)x100 |
|---------|---|---------------------------------|--|
| 1 | 0,0626 ^a ±0,0088 | 4,18±0,20 | 68,5±3,0 |
| 2 | 0,0818 ^a ±0,0002 | 2,34±0,09 | 89,6±0,4 |
| 3 | 0,0769 ^a ±0,0019 | 3,77±0,56 | 84,2±0,5 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). FA: ácido ferúlico; K: Coeficiente de partición; %EE: Eficiencia de extracción de FA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.24. DPPH, ABTS, rendimiento total de fenoles y eficiencia de extracción a diferentes composiciones de la alimentación

| Sistema | DPPH ($\mu\text{mol TE/g WS}$ b.s.) Fase superior | ABTS ($\mu\text{mol TE/g WS}$ b.s.) Fase superior | TPY (mg EAG/g of WS b.s.) Fase superior | %EE (mg EAG fase superior/ mg GAE en HBN)x100 |
|---------|---|---|--|--|
| 1 | 0,485 ^a ±0,018 | 5,24 ^a ±1,19 | 1,29 ^a ±0,14 | 28,0±2,9 |
| 2 | 0,458 ^a ±0,016 | 4,26 ^a ±0,71 | 4,51 ^b ±0,04 | 97,6±0,9 |
| 3 | 0,478 ^a ±0,016 | 4,23 ^a ±0,75 | 3,12 ^b ±0,04 | 67,5±0,8 |

Los valores son presentados como promedio±DS (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). TPY: Rendimiento total de fenoles; %EE: Eficiencia de extracción de compuestos fenólicos.





5. CONCLUSIONES



En esta Tesis Doctoral se estudió la recuperación de los compuestos fenólicos presentes en diferentes residuos agroforestales mediante el empleo de sistemas acuosos de dos fases (ATPS) como alternativa a los procesos convencionales de extracción con disolventes orgánicos. La obtención de compuestos fenólicos, se realizó a través del aprovechamiento de dos residuos forestales: restos de cizallado de chapas de *Eucalyptus globulus* y aserrín de *Eucalyptus grandis* y un residuo agrícola, la paja de trigo.

El trabajo se ha estructurado en tres líneas de actuación. En una primera fase se estudió la recuperación de compuestos fenólicos a partir de restos de cizallado de *Eucalyptus globulus* mediante dos tipos de ATPS. Por un lado, ATPS basados en polietilenglicol (PEG) 2000, agua y diferentes sales ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ y $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), y por otro lado ATPS basados en etanol, agua y sales ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 y $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$).

En una segunda línea de actuación, se evaluó la recuperación de compuestos fenólicos a partir de aserrín de *Eucalyptus grandis* mediante dos tipos de ATPS: los basados en PEG, agua y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y los basados en etanol, agua y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Finalmente, en la tercer línea de actuación, se evaluó la capacidad de un ATPS formado por Tween 20 (Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano), agua y un líquido iónico biocompatible (dihidrógeno citrato de colina (ChDHC)) para la extracción de ácidos fenólicos a partir de un hidrolizado de la paja de trigo (WS) y la partición de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico. Como paso previo fue necesaria la obtención de los datos de equilibrio para el ATPS seleccionado.

De los resultados obtenidos en la primera línea del presente trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- ✓ Se demostró la capacidad de los sistemas ATPS basados en PEG 2000+sal/es+agua y en etanol+sal/es+agua para extraer compuestos fenólicos con actividad antioxidante demostrada a partir de materia prima sin purificar (restos de cizallado de madera de *Eucalyptus globulus*).
- ✓ Con los sistemas basados en etanol+sal/es+agua se logran rendimientos de extracción en fenoles totales (0,40-5,36 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/ 100 mg madera en base seca b.s) superiores a los obtenidos con los sistemas basados en PEG 2000 (0,52-1,89 mg ácido gálico equivalente (EAG)/ 100 mg madera b.s).
- ✓ El contenido mayor en fenoles, 5,36 mg ácido gálico equivalente (EAG)/ 100 mg madera b.s, se obtuvo usando un ATPS formado con 40,6% (g/g) de etanol y con un 12% (g/g) de sulfato de amonio a 65°C.
- ✓ Los valores obtenidos de los coeficientes de reparto (K) con los sistemas basados en etanol (0,2-2,31) son inferiores a los de los sistemas basados en PEG 2000 (14,2-117). El mayor valor de K, 117, se obtuvo con el sistema ATPS formado con 16,4% (g/g) de PEG 2000 y con un 15,21% (g/g) de sulfato de amonio a 65°C.
- ✓ Para los ATPS estudiados se observó que el TPY aumenta con el aumento de la relación de volúmenes, del tiempo de extracción y con la disminución de la

CONCLUSIONES

relación sólido-líquido. Además, el rendimiento de extracción se ve favorecido con la disminución del pH. Por otro lado, la temperatura incrementa el TPY pero disminuye el coeficiente de reparto.

- ✓ Se confirmó la presencia de compuestos fenólicos con potencial actividad antioxidante en los restos de cizallado de madera de *Eucalyptus globulus*, siendo el más abundante el ácido elágico.
- ✓ En el caso particular de los sistemas basados en PEG+sal/es+agua los compuestos fenólicos tienen preferencia por la capa rica en PEG ($K>1$), y se encontró que se obtienen mayores rendimientos de extracción en fenoles cuando se trabaja con una alta relación de polímero/sal, debido al aumento de la hidrofobicidad de la capa rica en PEG.
- ✓ Con los sistemas basados en etanol+sal/es+agua, se vio que la migración de los compuestos fenólicos a la capa superior o inferior es fuertemente dependiente del tipo de sal utilizada y que el rendimiento de extracción en fenoles aumenta con la LRR.
- ✓ Se demostró que es suficiente con una hora de tiempo de sedimentación para lograr altos valores en rendimientos de extracción.

De los resultados obtenidos en la segunda línea del presente trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- ✓ Se confirmó la capacidad de los sistemas PEG+(NH₄)₂SO₄+agua y etanol+(NH₄)₂SO₄+agua para extraer y fraccionar parcialmente los compuestos fenólicos presentes en el aserrín.
- ✓ Los compuestos fenólicos migraron hacia las capas ricas en polímero y en etanol, para los sistemas basados en PEG y etanol, respectivamente. Los valores de K en los sistemas basados en PEG variaron entre 33,2 a 66,6 mientras que los sistemas basados en etanol, los valores de K variaron entre 8,3 a 12,1.
- ✓ El contenido mayor en fenoles totales, 1,3 mg EAG/ 100 mg madera b.s, se obtuvo usando el ATPS formado con 40,6% (g/g) de etanol y con un 12% (g/g) de sulfato de amonio a 65°C con una capacidad antioxidante FRAP de 14486 mmol de EAA/100 mg madera b.s.
- ✓ Se demostró para los sistemas basados en PEG que el peso molecular del polímero y la LRR tiene influencia en el TPY. Los valores más altos de TPY se obtuvieron con el menor MW y la mayor LRR, sin afectar la capacidad antioxidante FRAP.
- ✓ En cuanto los sistemas basados en etanol, se observó que al aumentar la relación de volúmenes, la temperatura y la LRR el TPY aumenta. Por otro lado, al aumentar la temperatura, el coeficiente de reparto disminuye.

De los resultados obtenidos en la tercera línea del presente trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- ✓ Se comprobó la capacidad del surfactante Tween 20 y el líquido iónico ChDHC en formar ATPS a 20, 40, 50 y 60°C.

- ✓ Se observó que la región inmiscible aumenta con la temperatura y los datos experimentales ajustaron a un modelo.
- ✓ La aplicación de los ATPS en la extracción del ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico a partir del hidrolizado de la paja de trigo revelaron altos porcentajes de eficiencia (más del 97% del contenido total de fenoles, 89% de ácido ferúlico y 93% de ácido *p*-cumárico) al sistema ATPS con la mayor concentración de Tween 20 (61,1% (g/g)) y altos valores de K.
- ✓ El método de extracción propuesto no implicó deterioro de la bioactividad, como se reflejó en los análisis de la capacidad antioxidante DPPH y ABTS.
- ✓ En los sistemas estudiados se demostró que los compuestos fenólicos tienen preferencia por la capa rica en Tween 20 y que la eficiencia aumenta con la concentración de Tween en la alimentación.
- ✓ Se demostró la aplicabilidad de los ATPS para la extracción de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico a partir del hidrolizado de la paja de trigo.

Por lo tanto, los resultados de este trabajo, confirman el potencial uso de los ATPS para extraer y fraccionar parcialmente los compuestos fenólicos, como una alternativa a las extracciones tradicionales con disolventes orgánicos. El uso de ATPS para esta aplicación puede tener impacto en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética.

Cabe destacar, que este estudio permite un enfoque inicial de la recuperación primaria de compuestos fenólicos a partir de residuos agroindustriales, siendo necesario pasos posteriores de proceso para llegar a los requerimientos de pureza necesarios para su aplicación.

Dependiendo del uso al que se destine el producto, los requerimientos de pureza serán diferentes, por ejemplo, si el producto se va destinar a ser un insumo de la industria farmacéutica, es probable que se requiera una alta pureza sea requerida, y por tanto la etapa de extracción deberá ser lo más selectiva posible. En cambio si el producto va a ser empleado como insumo para la industria de alimentos, otros compuestos que puedan estar presentes en los extractos también pueden tener un valor nutricional, y por tanto no habrá necesidad de que sean separados del producto.

En conclusión, se necesitarían más estudios para poder caracterizar mejor la partición de los compuestos fenólicos en los diferentes ATPS, evaluando las purezas de los mismos. Podría ser relevante estudiar la influencia del aumento de número de etapas de extracción en la pureza y también estudiar la posible reutilización de los componentes que forman los ATPS.





6. BIBLIOGRAFÍA



- Aguilar, O.; Rito-Palomares, M. 2010. Aqueous two-phase systems strategies for the recovery and characterization of biological products from plants. *J. Sci. Food Agric.* 90, 1385–1392.
- Akpınar, O.; Usal, G. 2015. Investigation of the effect of temperature and alkaline concentration on the solubilization of phenolic acids from dilute acid-pretreated wheatstraw. *Food Bioprod. Process.* 95, 272-280.
- Albertsson, P. 1986. *Partition of cell particles and macromolecules*. John Wiley & Sons: New York.
- Álvarez, M.S.; Rivas, M.; Deive, F.J.; Sanromán, M.A. Rodríguez, A. 2014. Ionic liquids and non-ionic surfactants: a new marriage for aqueous segregation. *RSC Adv.* 4, 32698-32700.
- Álvarez, M.S.; Esperança, J.M.S.S.; Deive, F.J.; Sanromán, M. A.; Rodríguez, A. 2015. A biocompatible stepping stone for the removal of emerging contaminants. *Sep. Purif. Technol.* 153, 91-98.
- Arranz Martínez, S. 2010. *Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación*. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Departamento de Bromatología II. Madrid. Tesis.
- Barreira, J.C.M.; Ferreira, I.C.F.R.; Oliveira, M.B.P.P.; Pereira, J.A. 2008. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chem.* 107, 1106-1113.
- Becker, J.S.; Thomas, O.R.T.; Franzreb, M. 2009. Protein separation with magnetic adsorbents in micellar aqueous two-phase systems. *Sep. Purif. Techn.* 65, 46-53.
- Belwal, T; Bhatt, I. D.; Rawal, R.S.; Pande, V. 2017. Microwave-assisted extraction (MAE) conditions using polynomial design for improving antioxidant phytochemicals in *Berberis asiatica* Roxb. ex DC. Leaves. *Ind. Crops Prod.* 95, 393–403.
- Benavides, J.; Rito-Palomares, M. 2008. Practical experiences from the development of aqueous two-phase processes for the recovery of high value biological products. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 133–142.
- Bucic-Kojic, A.; Planinic, M.; Tomas, S.; Bilic, M.; Velic, D. 2007. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food Eng.* 81, 236–242.
- Chen, J.; Spear, K.S.; Huddleston, J. G ; Rogers, R.D. 2005. Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. *Green. Chem.* 7, 64–82.
- Chen, X.; Dong, Q.; Yu, J.; Jiao F. 2013. Extraction of Tryptophan enantiomers by aqueous two-phase systems of ethanol and (NH₄)₂SO₄. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 1637-1645.

- Cláudio, A.F.M. ; Ferreira, A.M.; Freire, C.S.R.; Silvestre, A.J.D.; Freire, M.G.; Coutinho, J.A.P. 2012. Optimization of the gallic acid extraction using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. *Sep. Purif. Technol.* 97, 142-149.
- Conde, E.; Cadahia, E.; Garcia Vallejo, M.C.; Diez, R. 1996. Composición polifenólica de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*. *Invest. Agrar. Sist. Recur. For.* 5, 333–350.
- Dai, J.; Mumper, R.J. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 15, 7313-7352.
- Deive, F.J.; Ruivo, D.; Rodrigues, J.V.; Gomes, C.M.; Sanromán, M.A.; Rebelo, L.P.N.; Esperança, J.M.S.S.; Rodríguez, A. 2015. On the hunt for truly biocompatible ionic liquids for lipase-catalyzed reactions. *RSC Adv.* 5, 3386-3389.
- Dhamole, P.B.; Wang, B., Feng, H. 2013. Detoxification of corn stover hydrolysate using surfactant-based aqueous two phase system. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 1744-1749.
- Doussot, F.; Pardon, P.; Dedier, J.; De Jeso, B. 2000. Individual, species and geographic origin influence on cooperage oak extractable content (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl.). *Analysis.* 28,960-965.
- Dudonne, S.; Vitrac, X.; Coutiere, P.; Woillez, M.; Merillon, J. 2009. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1768–1774.
- Espitia-Saloma, E.; Vázquez-Villegas, P.; Aguilar, O.; Rito-Palomares, M. 2014. Continuous aqueous two-phase systems devices for the recovery of biological products. *Food Bioprod Process.* 92, 101-112.
- Eyles, A.; Davies, N.W.; Mohammed, C. 2003. Wound wood formation in *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*: anatomy and chemistry. *Can. J. For. Res.* 33, 2331–2339.
- Fennema, O.R. 1993. *Química de los alimentos*, Acirbia S.A: Zaragoza.
- Fernández-Agulló, A.; Freire, M.S.; González-Álvarez, J. 2015. Effect of the extraction technique on the recovery of bioactive compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes. *Ind. Crops Prod.* 64, 105-113.
- Frankel, E.N.; Meyer, A.S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1925–1941.
- Gomes G.A.; Azevedo, A.M.; Aires-Barros M.R.; Prazeres, D.M.F. 2009. Purification of plasmid DNA with aqueous two phase systems of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate. *Sep. Purif. Technol.* 65, 22–30.

- Gómez-Loredo, A.; Benavides, J.; Rito-Palomares, M. 2014. Partition behavior of fucoxanthin in ethanol-potassium phosphate two-phase systems, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 1637-1645.
- Hasmann, .F.A.; Santos, V.C.; Gurspilhares, D.B.; Pessoa-Junior, A.; Roberto, I.C. 2008. Aqueous two-phase extraction using thermoseparating copolymer: anew system for phenolic compounds removal from hemicelulosic hydrolysate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83,167–173.
- Hatti-Kaul, R. 2000. *Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols*. Humana Press Inc: Totowa.
- Iranmahbooba, J.; Nadima, F.; Monemi, S. 2002. Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. *Biomass Bioenerg.* 22, 401-404.
- Jokic, S.; Velic, D.; Bilic, M.; Bucic-Kojic, A.; Plannic, M.; Tomas, S. 2010. Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Czech Journal of Food Sciences.* 28(3), 206-212.
- Kashket, S. 1990. Sweetness and flavor enhanced compositions and method of preparing suchcompositions. *United States Patent.* 416480.
- Khanbabae, K.; van Ree, T. 2001. Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.* 18, 641–649
- Katayama, H.; Miyahara, M. 2006. Liquid–liquid phase equilibria of (ethanol or methanol plus water) containing either dipotassium hydrogen phosphate or sodium dihydrogen phosphate. *J. Chem. Eng. Data* . 5, 914-918.
- Khayati, G.; Daghsbandan, A.; Gilvari, H.; Pheyz-Sani, N. 2011. Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-phase Systems Containing Polyethylene Glycol 4000 and Two Different Salts of Ammonium. *Res. J. Appl. Sci. Eng. Technol.* 3(2), 96-98.
- Kim, S.; Dale, B.E. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenerg.* 26, 361-375.
- Kosa, M.; Ragauskas, A.J. 2013. Lignin to lipid bioconversion by oleaginous *Rhodococci*. *Green Chem.* 15, 2070-2074.
- Lang, Q.; Wai, C. M. 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta.* 53(4), 771-782.
- Lisong, N.M.; Rogers,J.K.; Westoby, M.; Conley, L.; Pieracci, J. 2010. Downstream antibody purification using aqueous two-phase extraction. *Biotechnol. Prog.* 26,1662-1670.
- Lucena de Souza, R.; Barbosa, J.M.P.; Zanin, G.M.; Lobão, M.W.N. ; Soares, C.M.F ; Lima, A.S. 2010. Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase system of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161, 288-300.

- Madhavi, D.L.; Despande, S.S.; Salunke, D.K. 1996. *Food antioxidants. Technological, toxicological and health perspectives*. Marcel Dekker: New York. 1996.
- Magalhaes, L., Segundo, M., Reis S., and Lima, J. 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta.* 613, 1-19.
- Max, B.; Salgado J.M.; Cortés, A.; Domínguez, J.M. 2010. Extraction of phenolic acids by alkaline hydrolysis from the solid residue obtained after prehydrolysis of trimming vine shoots. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1909-1917.
- Mertens-Talcott, S.U.; Talcott, S.T.; Percival, S.S. 2003. Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells1-3. *J. Nutr.* 133, 2669-2674.
- Moch, R.W. 1986. Pathology of BHA- and BHT- induced lesions. *Food Chem. Toxicol.* 24, 167-1169
- Moldes, A.B.; Torrado, A.; Converti, A.; Domínguez, J.M. 2006. Complete bioconversion of hemicellulosic sugars from agricultural residues into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 135, 219-227.
- Moon, J.K.; Shibamoto, T. 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agric. Food. Chem.* 57, 1655-1666.
- Moreira, M.M; Morais, S.; Carvalho, D.O.; Barros, A.A., Delerue-Matos, C., Guido, L.F. 2013. Brewer's spent grain from different types of malt: Evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds. *Food Res. Int.* 54, 382-388.
- Mota, F.L.; Queimada, A.J.; Pinho, S.P.; Macedo, E.A. 2008. Aqueous solubility of some natural phenolic compounds. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47, 5182-5189.
- Moure, A.; Cruz, J.M.; Franco, D.; Domínguez, J.M; Sineiro, J.; Domínguez, H. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 72, 145-171.
- Muraleedharan, G.; Nair, O. Method and compositions producing cherry derived products. 2002. Board of Trustees of Michigan State University. *United States Patent No.* 6423365.
- Murugesan, T.; Perumalsamy, M. 2005. Liquid-Liquid Equilibria of Poly(ethylene glycol) 2000 + Sodium Citrate + Water at (25, 30, 35, 40 and 45)°C. *J. Chem. Eng. Data.* 50, 1392-1395.
- Narayanan, B.A.; Geoffroy, O.; Willingham, M.C.; Re, G.G.; Nixon, D.W. 1999. p53/p21(WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. *Cancer. Lett.* 136, 215-221.
- Ooi, C.W.; Tey, B.T.; Hii, S.L.; Kamal, S.M.M.; Lan, J.C.W.; Ariff, A. 2009. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt based aqueous two-phase systems. *Process Biochem.* 44, 1083-1087.

- Peng, Q.; Li, Z.; Li, Y. 1994. Thermodynamics of potassium hydrogen phosphate-potassium dihydrogen phosphate-polyethylene glycol aqueous two-phase systems. *Fluid. Phase Equilibr.* 95, 341-357.
- Perrier, E.; Mariotte, A.; Boumendjel, A.; Bresson-rival, D. 2001. Flavonoid esters and their use notably in cosmetics. *United States Patent*. 6235294
- Plechkova, N.V.; Seddon, K.R. 2008. Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chem. Soc. Rev.* 37, 123-150.
- Pin K.Y.; Chuah T.G.; Abdull Rashih A.; Rasadah M.A.; Law, C.L.; Choong, T.S.Y. 2006. Aqueous extraction of hydroxychavicol from Piper betle L. leaves, in 1st International Conference on Natural Resources Engineering and Technology, Proc. INRET2006 Putrajaya, Malaysia. 146–152.
- Pokorny, J.; Yanishelieva, N.; Gordon, M. 2001. *Antioxidants in food. Practical Applications*. Boca Raton. CRC Press: New York.
- Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food. Chem.* 53, 4290–4302.
- Radojković, M.; Zekovic, Z.; Jokic, S.; Vidovic, S.; Lepojevic, Z. ; Milocevic, S. 2012. Optimization of solid-liquid extraction of antioxidants from black mulberry leaves by response surface methodology. *Food Technol. Biotechnol.* 50 (2), 167–176.
- Ratanapongleka, K. 2010. Recovery of Phetsom biological products in aqueous two phase systems. *Int. J. Chem. Eng. Appl.* 1 (2), 191-198.
- Ratanapongleka, K.; Phetsom, J. 2011. Extraction in Two-Phase Systems and Some Properties of Laccase from Lentinus polychrous. *WASET.* 57, 812-815.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26, 1231-1237.
- Reis, I.A.O.; Santos, S.B.; Santos, L.A.; Oliveira, N.; Freire, M.G.; Pereira, J.F.B; Ventura, S.P.M.; Coutinho, J.A.P; Soares, C.M.F; Lima, A.S. 2012. Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. *Food Chem.* 135, 2453-2461.
- Reis, I.A.O.; Santos, S.B.; Pereira, F.D.S.; Sobral, C.R.S; Freire, M.G.; Freitas, L.S.; Soares, C.M.F.; Lima, A.S. 2014. Extraction and recovery of rutin from acerola waste using alcohol-salt-based aqueous two-phase systems. *Separ. Sci. Technol.* 49, 656–663.
- Ren, H.; Zong, M-H.; Wu, H.; Li, N. 2016. Efficient pretreatment of wheat straw using novel renewable cholinium ionic liquids to improve enzymatic saccharification. *Ind. Eng. Chem. Res.* 55, 1788-1795.

- Richter, B.E.; Joes, B.A.; Ezzell, J.L.; Porter, N.L. 1996. Accelerated solvent extraction: A technique for sample separation. *Anal. Chem.* 68, 1033–1039.
- Rito-Palomares, M. 2004. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *J.Chromatogr. B.* 807(1), 3-11.
- Romaní, A.; Garrote, G.; Alonso, J.; Parajó, J. 2010. Bioethanol production from hydrothermally pretreated Eucalyptus globulus wood. *Bioresour. Technol.* 101, 8706-8712.
- Rosa, P.A.J.; Ferreira, I.F.; Azevedo, A.M.; Aires-Barros, M.R. 2010. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *J.Chromatogr. A.* 1217, 2296-2305.
- Rowell, M.R.; Pettersen, R.; Tshabalala, M.A. 2013. *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*, CRC Press: New York.
- Salabat, A.; Moghadam, S.T.; Far, M.R. 2010. Liquid-Liquid equilibria of Aqueous Two-Phase Systems composed of TritonX-100 and sodium citrate or magnesium sulfate salts. *Calphad.* 34, 81-83.
- Salic, A.; Tusek, A.; Fabek, D.; Rukavina, I.; Zelic, B. 2011. Aqueous two-phase extraction of polyphenols using a microchannel system - process optimization and intensification. *Food Technol. Biotechnol.* 49, 495–501.
- Saucedo-Pompa, S.; Rojas-Molina, R.; Aguilera-Carbó, A.F.; Saens-Galindo, A.; Garza de la H, Jasso-Cantú, D.; Aguilar, C.N. 2009. Edible Film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. *Food Res. Int.* 42, 511-515.
- Serrano M.J. 2010. *Evaluación de la actividad antioxidante para el aprovechamiento del muérdago que infesta la zona chinampera de xochimilco*. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Tesis.
- Sheldon, R.A. 2014. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. *Green Chem.* 16, 950-963.
- Shen, S. ; Chang, Z.; Liu, H. 2006. Three-liquid-phase extraction systems for separation of phenol and p-nitrophenol from wastewater. *Sep. Purif. Technol.* 49, 217-222.
- Simental-Martínez, J.; Montalvo-Hernández, B.; Rito-Palomares, M.; Benavides, J. 2014. Application of aqueous two-phase systems for the recovery of bioactive low-molecular weight compounds. *Sep. Sci. Technol.* 49, 1872-1882.
- Singh, S.; Singh, R.P. 2008. *In Vitro* Methods of Assay of Antioxidants: An Overview. *Food Rev. Int.* 24, 392–415.
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-158.

- Szollozi, R.; Szollozi-Varga, I. 2002. Total antioxidant power in some species of *Labiatae* (Adaptation of FRAP method). *Acta Biol Szeged.* 46(3-4),125-127.
- Tejeda, A.; Montesinos, R.M; Guzman, R. 1995. *Bioseparaciones*.Unison ,Hermosillo Sonora.
- Tilay, A.; Bule, M.; Kishenkumar, J.; Annapure, U. 2008. Preparation of Ferulic Acid from Agricultural Wastes: Its Improved Extraction and Purification. *J. Agric. Food Chem.* 56, 7644-7648.
- Torres-Plasencia, G.; Gutiérrez-Arnillas, E.; Deive, F.J.; Sanromán, M.A.; Rodríguez. A. 2015. Triggering phase disengagement of 1-alkyl-3 methyl imidazolium chloride ionic liquids by using inorganic and organic salts. *J. Chem. Thermodyn.* 88, 1-7.
- Treybal, R. E. 1963. *Liquid Extraction*. McGraw-Hill: New York.
- Tuck, C.O.; Pérez, E.; Horváth, I.T.; Sheldon, R.A.; Poliakoff, M. 2012. Valorization of biomass: Deriving more value from waste. *Science* 337, 695-699.
- Ulloa, G.; Coutens, C.; Sánchez, M.; Sineiro, J.; Rodríguez, A.; Deive, F.J.; Núñez, M.J. 2012. Sodium salt effect on aqueous solutions containing Tween 20 and Triton X-102. *J. Chem. Thermodyn.* 47, 62-67.
- van Heiningen , A.; Genco, J.; Yoon, S.; Tunc, M.S.; Zou, H.; Luo, J.; Mao, H.; Pendse, H. 2011. *Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Fibers from Forest Biomass*. ACS Symposium Series. 17, 443-473.
- Vázquez, G.; Fontenla, E.; Santos, J.; Freire, M.S.; González-Álvarez, J.; Antorrena, G. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Ind. Crops Prod.* 28, 279–285.
- Ventura, J.; Belmares-Cerda, R.; Aguilera-Carbó, A.; Contreras-Esquivel, J.C.; Rodriguez-Herrera, R.; Aguilar, C. N. 2008. Fungal biodegradation of tannins from creosote bush (*Larrea tridentata* Cov.) and tar bush (*Fluorecencia cernua*) for gallic and ellagic acids production. *Food Technol. Biotech.* 46, 213–217.
- Vinatoru, M.; Toma, M.; Radu, O.;Filip, P. I.; Lazurca, D.; Mason, T. J. 1997. The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrason. Sonochem.* 4(2), 135-139.
- Voros, N. ; Proust, P. ; Fredenslund A. 1993. Liquid-liquid phase equilibria of aqueous two-phase systems containing salts and polyethylene glycol. *Fluid Phase Equilib.* 90, 333-353.
- Wang, L.; Weller, C.L.. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 300–312.
- Wang, H.; Dong, Y.; Xiu, Z.L. 2008. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of piceid, resveratrol and emodin from *Polygonum cuspidatum* by ethanol/ammonium sulphate systems. *Biotechnol. Lett.* 30, 2079–2084.

Wang, Y.; Yan, Y.S.; Hu, S.P.; Han, J.; Xu, X.H. 2010. Phase diagrams of ammonium sulfate + ethanol/1-propanol/2-propanol + water aqueous two-phase systems at 298.15 K and correlation. *J. Chem. Eng. Data.* 55, 876-881.

Willauer, H.D.; Huddleston, J.G.; Li, M.; Rogers, R.D. 2000. Investigation of aqueous biphasic systems for the separation of lignins from cellulose in the paper pulping process. *J. Chromatogr. B.* 743, 127-135.

Wu, X.; Liang, L.; Zou, Y.; Zhao, T.; Zhao, J.; Li, F.; Yang, L. 2011. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). *Food Chem.* 129, 443-453.

Zafarani-Moattar, M.T.; Hamzehzadeh, S. 2009. Phase diagrams for the aqueous two-phase ternary system containing the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide and tri-potassium citrate at T=(278.15, 298.15, and 318.15) K. *J. Chem. Eng. Data.* 54, 833-841.

Zhang, Y.; Cremer, P.S. 2006. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Curr. Opin. Chem Biol.* 10, 658-663.

<http://www.pycnogenol.com>

<http://www.enzo.co.nz>

<http://www.reportlinker.com/p02841852-summary/Antioxidants-Market-Global-Industry-Analysis-Size-Share-Growth-Trends-and-Forecast.html>.

<https://chemicalize.com/>

LISTA DE PUBLICACIONES

- Xavier, L.; Freire, M.S.; Vidal-Tato, I.; González-Álvarez, J. 2014. Aqueous two-phase systems for the extraction of phenolic compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 1772-1778.
- Xavier, L.; Freire, M.S.; Vidal-Tato, I.; González-Álvarez, J. 2015. Application of aqueous two phase systems based on polyethylene glycol and sodium citrate for the recovery of phenolic compounds from eucalyptus wood. *Maderas. Cienc. Tecnol.* 7, 345-354
- Xavier, L.; Freire, M.S.; Vidal-Tato, I.; González-Álvarez, J. 2017. Recovery of phenolic compounds from eucalyptus wood wastes using ethanol-salt-based aqueous two-phase systems. *Maderas. Cienc. Tecnol.* 19 (1), 3-14.
- Xavier, L.; Freire, M.S.; Vidal-Tato, I.; González-Álvarez, J. 2017. Recovery of Phenolic Compounds from Eucalyptus globulus Wood Wastes using PEG/phosphate Aqueous Two-phase Systems. *Waste Biomass Valor.* 8, 443-452.
- Xavier, L.; Deive, F.J.; Sanromán, M.A.; Rodríguez, A. ; Freire, M.S.; González-Álvarez, J.; Gortáres-Moroyoqui, P.; Ruíz-Cruz, S; Ulloa, R.G. 2017. Increasing the greenness of lignocellulosic biomass biorefining processes by means of biocompatible separation strategies. *ACS Sustainable Chem. Eng.* En revisión.

LISTA DE COMUNICACIONES A CONGRESOS

- González-Álvarez, J; Xavier, L.; Freire, M.S.; Vidal-Tato, I. 2016 Aqueous two phase extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from Eucalyptus grandis sawdust. XXII Congreso Luso galaico de Química, Braganca, Portugal. 9 a 11 noviembre 2016. *Libro de Resúmenes*, 267. Sociedad Portuguesa de Química: Lisboa. ISSN/ISBN: 978-989-8123-1

